



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**ESTUDIO TEÓRICO DE LA ACTIVACIÓN DE PRAZOLES Y SUS EFECTOS  
LOCAL Y GLOBAL EN UN MODELO DE LA H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa GÁSTRICA  
HUMANA**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA  
**M. en C. JORGE REYES GONZÁLEZ**

TUTOR PRINCIPAL  
**Dr. FERNANDO CORTÉS GUZMÁN**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
**Dr. JUAN RAÚL ÁLVAREZ IDABOY**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.  
**DR. LUIS GERARDO ZEPEDA VALLEJO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS QUÍMICAS

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2014**

El presente trabajo se realizó en el aula de alumnos de la sección de fisicoquímica, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Fernando Cortés Guzmán.

**Agradecimientos:**

A la DGAPA-PAPIT (IN208113) por el apoyo económico otorgado a este proyecto.

Al CONACYT por la beca de estudios de doctorado (216102).

A la DGTIC-UNAM por el tiempo de cómputo.

Al Dr. Fernando Cortés Guzmán por todo su apoyo académico, moral y la confianza que me ha dado, desde que me invitó a ser parte de su grupo de investigación.

Al personal académico de la Unidad de Cómputo y Tecnologías de la Información y comunicación del Instituto de Química de la UNAM: María Magdalena Aguilar Araiza, Gladys Edith Cortés Romero y David Vázquez por el soporte en cómputo brindado.

Al Dr. José Correa Basurto y a la M. en C. Gema Lizbeth Ramírez Salinas por su asesoría en dinámicas moleculares.

A los doctores que amablemente revisaron la presente tesis y contribuyeron en gran medida a mejorarla: Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy, Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez y Dr. Tomás Rocha Rinza.

**Dedicatorias:**

A mis padres Jorge y María del Rosario, mis hermanos Eduardo e Iván, y especialmente a mi esposa Elida por acompañarme en esta etapa de mi vida.

### Presentaciones en congresos:

- Presentación oral del trabajo titulado: "Modelado y dinámica molecular de la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana y efecto del timoprazol sobre su estructura" en el Simposio Interno del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable. Toluca, Estado de México. Febrero 2014.
- Presentación del cartel titulado: "Interacciones Específicas del Residuo Modificado CYS-Timoprazol en las posiciones 813 y 822 en un modelo de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana". En el simposio "Advances in Quantum Chemical Topology". Ciudad Universitaria, México D.F. Octubre 2013.
- Presentación del cartel titulado: "Modelado y dinámica molecular de la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana". En la XI Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. Noviembre 2012.
- Presentación oral del trabajo titulado: "Modelado y dinámica molecular de la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana". quimiUNAM 2012. Ciudad Universitaria, México D.F. Noviembre 2012.
- Presentación del cartel titulado: "Estudio teórico de la activación farmacológica del timoprazol y su reacción con cisteínas específicas de la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa" en el Simposio Interno del Instituto de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F. Diciembre 2011
- Presentación del cartel titulado: "Estudio teórico de la activación profármaco-fármaco del timoprazol y su interacción con cisteínas específicas en la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa" en el Simposio Interno del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable. Toluca, Estado de México. Diciembre 2011
- Presentación oral del trabajo titulado: "Estudio teórico de la activación profármaco-fármaco del timoprazol y su interacción con cisteínas específicas en la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa" en el 46° Congreso Mexicano de Química. Querétaro, Querétaro. Septiembre 2011

### Publicación:

- **Reyes-González J. Gómez R., Cortés-Guzman F.** Theoretical study of the Smiles rearrangement in the activation mechanism of proton pump inhibitors. *Journal of Physical Organic Chemistry*. (2012) 25, 230-238.

## Resumen

El exceso en la producción de ácido gástrico produce enfermedades como la gastritis y la enfermedad de reflujo gastroesofágico, padecimientos comunes en personas expuestas a estrés y con un alto consumo de irritantes. La alternativa terapéutica de mayor uso para este tipo de enfermedades son los inhibidores de la bomba de protones, también llamados prazoles, que al unirse mediante un enlace covalente, con cisteínas específicas bloquean el ciclo catalítico de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica, enzima responsable de la secreción de ácido clorhídrico en el estomago. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual los prazoles se bioactivan para poder unirse a la enzima no está bien definido.

A la fecha, no se cuenta en la literatura con un modelo cristalográfico de la bomba de protones humana, por lo que ha sido necesario crear modelos a partir de proteínas homólogas, como la  $Na^+/K^+$  ATPasa, para crear representaciones atómicas de dicha enzima con el fin de desarrollar fármacos que bloqueen su actividad catalítica.

En base a lo planteado anteriormente, esta tesis consiste en tres estudios teóricos. El primero se enfoca en el proceso de bioactivación de los prazoles reportados en la literatura y la manera en que esta bioactivación se modifica al realizar sustituciones estructurales en la molécula base de los prazoles. La segunda parte aborda la formación del enlace disulfuro entre el timoprazol y una cisteína, considerando el efecto del disolvente en este proceso. Finalmente, en la tercera parte de esta tesis se realiza el modelado y dinámica molecular de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana a partir de su secuencia de aminoácidos y tomando como molde la enzima homóloga  $Na^+/K^+$  ATPasa de cerdo, considerando la presencia de una bicapa de fosfolípidos en un ambiente acuoso neutro. Además, se estudia el efecto que produce el timoprazol al estar unido con las cisteínas 815 y 824 sobre la estructura de un modelo de la bomba de protones humana de manera local y global, tras 50 ns de simulación de dinámica molecular.

## Abstract

The excessive production of gastric acid causes diseases such as gastritis and gastroesophageal reflux disease, which are common in people exposed to stress and a high intake of irritants. The most widely used therapeutic option for this kind of diseases are the proton pump inhibitors (PPIs), also called prazoles, that bind through a covalent bond to specific cysteines, blocking the catalytic cycle of the gastric  $H^+/K^+$  ATPase. This enzyme is responsible of hydrochloric acid secretion in stomach. However, the bioactivation mechanism of prazoles and the way in which such molecules affect the enzyme is not well defined.

Currently, it does not exist a crystallographic model of the human proton pump reported in the literature, so it was necessary to create models from homologous proteins, such as  $Na^+/K^+$  ATPase, to create atomic representations of  $H^+/K^+$  ATPase in order to develop drugs that block its catalytic activity.

Therefore, this thesis is divided into three theoretical studies. First, the prazoles bioactivation process and the substituent effect were done. Second, we discussed the disulfide bond formation between a cysteine and timoprazole, considering the solvent effect in this process. Then, we modelled a gastric human  $H^+/K^+$  ATPase from its amino acid sequence, taking as template the homologous enzyme  $Na^+/K^+$  ATPase of pig, considering the presence of a phospholipid bilayer in a neutral aqueous environment. Furthermore, we analyzed the local and global effects of timoprazole linked to cysteines 813 and 822 on the structure of a model of human proton pump after a 50 ns MD simulation.

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Secreción de ácido gástrico y enfermedades relacionadas.....	3
2.2. H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa gástrica.....	5
2.3. Inhibidores y antagonistas de la bomba de protones.....	8
2.4. Métodos teóricos computacionales.....	12
2.4.1. Métodos semiempíricos.....	12
2.4.2. Funcionales de la densidad.....	12
2.4.3. Átomos en moléculas.....	13
2.4.4. Dinámica molecular.....	17
2.5. Metodologías de análisis de dinámicas moleculares.....	19
2.6. Modelado de proteínas por homología.....	21
3. Planteamiento del problema.....	22
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	22
5.1. Mecanismo de activación de los prazoles.....	22
5.2. Formación del enlace disulfuro entre la forma activa del timoprazol y una cisteína.....	23
5.3. Modelado y dinámicas moleculares de la H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa gástrica humana.....	23
5.4. Estudio de los sitios reactivos del timoprazol en los sistemas 815 y 824.....	23
6. Metodología.....	23
6.1. Mecanismo de activación de los prazoles.....	23
6.2. Formación del enlace disulfuro entre la forma activa del timoprazol y una cisteína.....	24
6.3. Modelado y dinámicas moleculares de la H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa gástrica humana.....	24
6.4. Estudio de los sitios reactivos del timoprazol en los sistemas 815 y 824.....	26



7. Resultados y análisis de resultados.....	27
7.1. Mecanismo de activación de los prazoles.....	27
7.1.1. Análisis conformacional del timoprazol.....	29
7.1.2. Transposición de Smiles del timoprazol.....	33
7.1.3. Análisis conformacional de los prazoles sustituidos.....	35
7.1.4. Transposición de Smiles de los prazoles sustituidos.....	36
7.1.5. Correlaciones.....	38
7.2. Formación del enlace disulfuro entre la forma activa del timoprazol y una cisteína.....	40
7.3. Modelado y dinámicas moleculares de la H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa gástrica humana.....	41
7.3.1. Modelado y dinámica molecular del sistema silvestre.....	41
7.3.2. Modelado y dinámica molecular del sistema 815.....	48
7.3.3. Modelado y dinámica molecular del sistema 824.....	54
7.4. Estudio de los sitios reactivos del timoprazol en los sistemas 815 y 824.....	59
7.4.1. Sitio reactivo del residuo CYT 815.....	60
7.4.2. Sitio reactivo del residuo CYT 824.....	62
8. Conclusiones.....	64
9. Bibliografía.....	67
10. Anexos.....	71
Anexo 1. Ejemplo del archivo de entrada de la dinámica molecular de 50 ns para la equilibración de cada uno de los sistemas estudiados .....	71
Anexo 2. Parametrización del residuo CYT.....	72
Anexo 3. Detalles de la regresión lineal de las gráficas A y B de la figura 19.....	77
Anexo 4. Resultados de QMEAN, ANOLEA y Ramachandran.....	78
Anexo 5. Tablas y figuras de los puntos críticos de enlace.....	111

## 1. Introducción.

Actualmente, la gastritis y la enfermedad por reflujo esofágico son padecimientos bastante comunes en la población citadina mundial y son debidos principalmente a tres factores: el ritmo de vida estresante, costumbres alimenticias inadecuadas, y la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* en las células epiteliales gástricas. Estos padecimientos tienen en común un exceso en la producción de ácido clorhídrico gástrico, que rebasa la protección endógena proporcionada por el moco de la mucosa gástrica, provocando inflamación tisular y, en casos más severos, la formación de úlceras gástricas.

El omeprazol es la alternativa terapéutica de mayor uso a nivel mundial para el tratamiento de gastritis y la enfermedad por reflujo esofágico. Este fármaco ha estado en el mercado desde 1989 y pertenece a la familia de los inhibidores de la bomba de protones (PPIs, por sus siglas en inglés), también llamados prazoles, en la que también se encuentran el lansoprazol, pantoprazol, tenatoprazol, rabeprazol y picoprazol. Los prazoles inhiben la actividad de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica, enzima responsable de la secreción de ácido estomacal y que está constituida por dos subunidades, la  $\alpha$  y la  $\beta$ . Los prazoles se unen a ella mediante un enlace disulfuro con la cisteína 813 y/o con la 822, que están situadas en la subunidad  $\alpha$  de la enzima. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la formación de la especie reactiva de los prazoles, aún no se conoce detalladamente y, actualmente, no se cuenta con una estructura tridimensional de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana obtenida de manera experimental. Se han propuesto en la literatura modelos construidos a partir de la  $Na^+/K^+$  ATPasa y la  $Ca^{2+}$  ATPasa, que mediante el modelado por homología, han servido de molde para el diseño de moléculas, como los antagonistas de la bomba de protones.

El avance tecnológico de equipos de cómputo y programas computacionales ha hecho posible modelar blancos farmacológicos en diferentes condiciones y estudiar complejos ligando-receptor para determinar el tipo de interacciones que presentan a lo largo del tiempo, que dependiendo del sistema, oscilan en el rango de nanosegundos a microsegundos. Esto abre la posibilidad de estudiar mecanismos de acción farmacológica y la posibilidad de diseñar nuevos fármacos interaccionando en su probable sitio de acción de manera teórica.

En base al problema de salud que representan las enfermedades relacionadas con un exceso en la producción de ácido gástrico y a las dudas que aún permanecen sobre el mecanismo de acción de los prazoles, es necesario esclarecer la forma en que se comportan los prazoles en su fase de bioactivación y estudiar los efectos locales y globales que ejercen sobre la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana.

En esta investigación se estudió el mecanismo de bioactivación de los prazoles con la teoría del funcional de la densidad encontrándose que los prazoles tienen cinco conformeros estables, uno de ellos corresponde a la conformación reactiva, que permite que

se lleve a cabo la transposición de Smiles, necesaria para la formación de la especie reactiva. La estabilidad de los conformeros puede ser explicada por la presencia de enlaces de hidrógeno, efectos estereoelectrónicos debidos al par libre de electrones del átomo de azufre e interacciones  $N^{\cdots}C$  y  $N^{\cdots}S$ . El primer paso de la transposición de Smiles es una adición nucleofílica hacia el bencimidazol por la parte de la piridina, la cual depende de la diferencia de la población electrónica de los átomos involucrados en el ataque. El segundo paso produce ácido sulfénico mediante una reacción concertada donde el rompimiento del enlace S-C tiene lugar al mismo tiempo que la migración de un protón, este paso está determinado por la población electrónica del átomo de azufre.

Posteriormente, se construyeron tres modelos de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana, mediante la técnica de modelado por homología, a partir de la estructura cristalina de la  $Na^+/K^+$  ATPasa de cerdo. El primer modelo denominado silvestre consistió en la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica con sus dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . El segundo, llamado sistema 815, consistió en la bomba de protones humana con el enlace disulfuro entre el timoprazol con la cisteína 815 y, finalmente, el tercer modelo denominado sistema 824 fue la bomba de protones con el timoprazol enlazado mediante un enlace disulfuro con la cisteína 824. En estos tres modelos la bomba de protones fue embebida en una bicapa de fosfolípidos, en un ambiente acuoso neutro explícito. Los tres modelos se sometieron a dinámicas moleculares de 50 ns, después de las cuales, se estudiaron los efectos locales y globales del timoprazol sobre la estructura proteica de la bomba de protones gástrica humana en una estructura representativa de los últimos 10 ns de simulación de cada sistema. El efecto global del timoprazol sobre la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana consiste en un movimiento considerable de residuos pertenecientes a asas de la subunidad  $\alpha$ , situados en la parte citoplasmática de la proteína, residuos pertenecientes a asas de la subunidad  $\beta$  situados en la parte extracelular de la proteína y modificaciones en las estructuras de hélices  $\alpha$  en los dominios transmembranales de la proteína. El estudio del efecto local consistió en determinar los residuos con los que el timoprazol interacciona en el sitio reactivo de los sistemas 815 y 822, utilizando como criterio la densidad electrónica asociada a los puntos críticos de enlace de cada interacción. En los sistema 815 y 824, se identificaron los residuos que interaccionan con el producto de la transposición de Smiles del timoprazol del residuo CYT. En el sistema 815 fueron los siguientes: asparagina 140, valina 333 y arginina 330, por su parte, en el sistema 824 fueron: la metionina 986, tirosina 142, y fenilalanina 820. Se propone que la suma de los efectos local y global de como resultado modificaciones estructurales que impidan el ciclo catalítico de la enzima.

## 2. Antecedentes

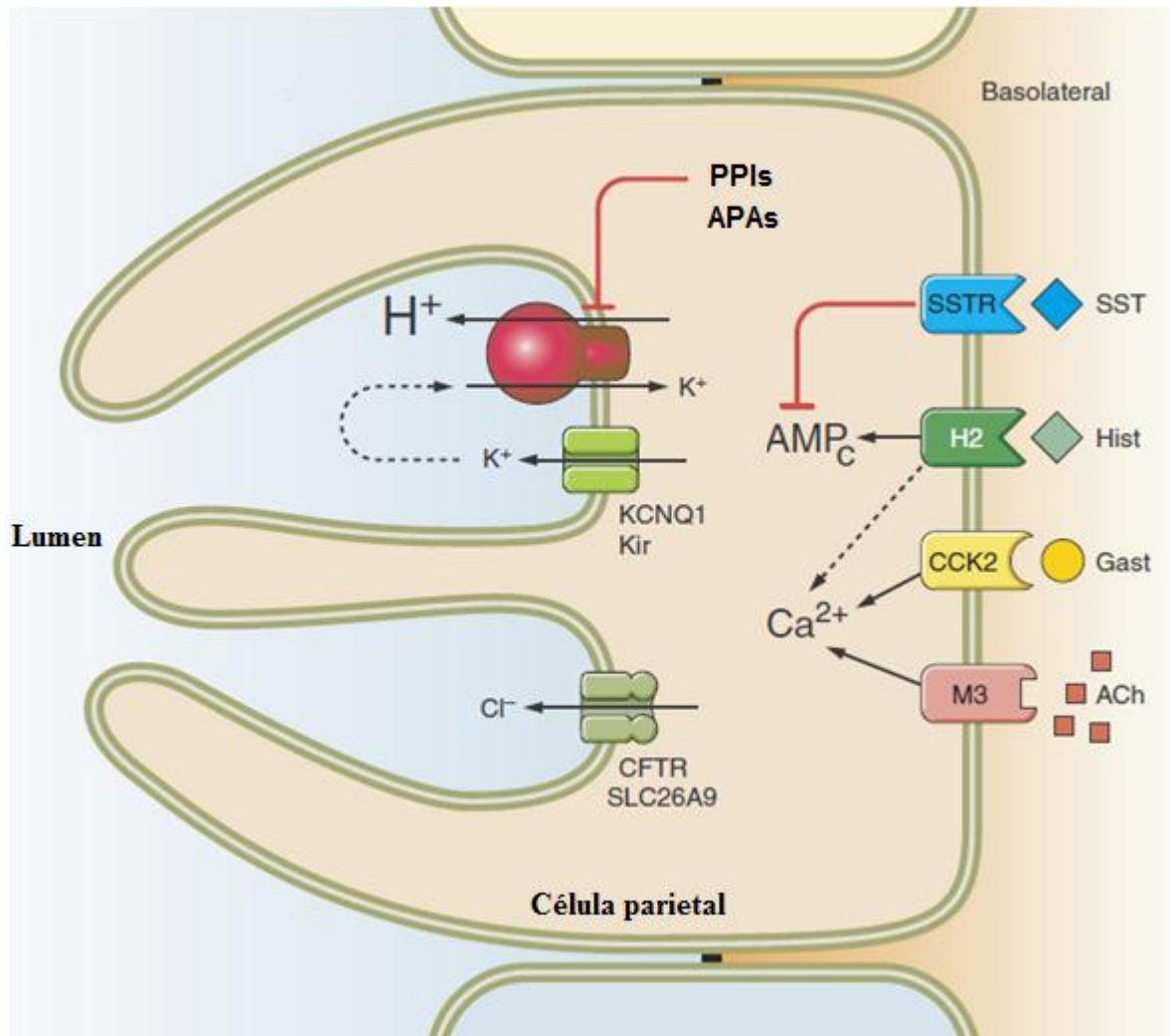
### 2.1. Secreción de ácido gástrico y enfermedades relacionadas.

La función principal de la mucosa gástrica es la secreción de ácido clorhídrico, sustancia indispensable para la digestión de alimentos y que sirve como barrera química contra agentes patológicos ingeridos oralmente. Esta mucosa posee glándulas que contienen células parietales que secretan protones en el lumen gástrico, para acidificar el contenido del estómago. El ácido clorhídrico gástrico es una sustancia corrosiva, por lo que la mucosa gástrica tiene que protegerse a sí misma de posibles daños provocados por el ácido. Esta protección la lleva a cabo mediante la secreción de moco realizada por las células mucosas del cuello y con la regulación de la secreción de ácido. Existe una gran variedad de células endócrinas especializadas en la mucosa gástrica que están involucradas en la regulación de la secreción de ácido gástrico, de manera que una perturbación en los mecanismos protectores puede conducir a daño tisular severo, llegando a causar ulceraciones gástricas.

La secreción de ácido gástrico depende de la extrusión apical de tres iones: los protones, que son bombeados al lumen gástrico por la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica, acidificando el contenido gástrico hasta valores de pH menores a 1; iones cloruro, que son secretados a través de los canales de cloruro apicales, proporcionándole contraiones a los protones y, finalmente, cationes de potasio que salen apicalmente de la célula parietal mediante un mecanismo reciclador que alimenta el transporte recíproco de protones, realizado por la  $H^+/K^+$  ATPasa<sup>1</sup> (este mecanismo se ilustra en la **figura 1**).

Las terapias principales para tratar gastritis, úlceras pépticas y la enfermedad de reflujo gastroesofágico consisten en evitar la estimulación de las células parietales, antagonizando los receptores de histamina tipo  $H_2$ , o inhibiendo directamente el paso final de la secreción ácida, es decir, la bomba de protones gástrica  $H^+/K^+$  ATPasa.<sup>2</sup>

Tanto los receptores de histamina  $H_2$  como la bomba de protones gástrica, en sus respectivos estados funcionales, se encuentran localizados en las células parietales del estómago. La histamina interactúa con el receptor  $H_2$ , provocando la secreción de ácido gástrico mediante cambios morfológicos de la célula parietal, que alcanzan un estado estimulado. La  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica está localizada en los canalículos del estado estimulado de la célula parietal del estómago y secreta ácido mediante un intercambio de hidrógeno por potasio, dependiente de ATP.<sup>3</sup>



**Figura1.** Esquema de la célula parietal. Este tipo de célula contiene mecanismos de transporte iónico que llevan a cabo la secreción de ácido clorhídrico concentrado. La activación de receptores secretagogos basolaterales incrementa los niveles de AMPc y de calcio, provocando la inserción apical y activación de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. La somatostatina reduce los niveles intracelulares de AMPc. Abreviaturas: Ach (acetilcolina); APAs (antagonistas de la bomba de protones); PPIs (inhibidores de la bomba de protones); Gast (gastrina); Hist (histamina); SST (somatostatina).

Los antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> alivian rápidamente los trastornos de la úlcera péptica, pero no de la enfermedad de reflujo gastroesofágico, la cual requiere de una mayor inhibición de la secreción de ácido gástrico, que es lograda gracias a la actividad farmacológica de los inhibidores de la bomba de protones (PPIs, proton pump inhibitors), que inhiben la función de la proteína H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica.<sup>4</sup>

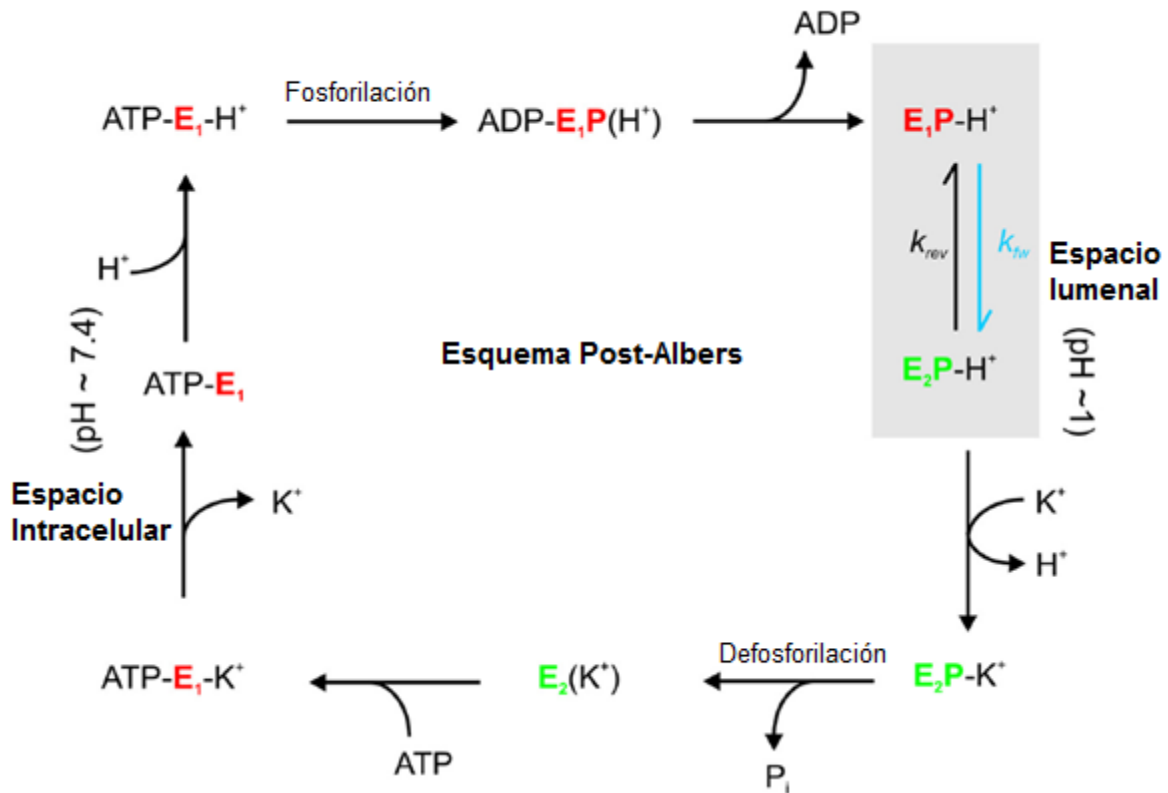
## 2.2. H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica.

La H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa se encuentra en las células parietales del estómago y en menor medida en la médula renal.<sup>3</sup> Esta enzima se encuentra en las membranas tubulares citoplasmáticas de la célula parietal en su estado relajado y, posteriormente, en su estado activado, en las microvellosidades del canalículo secretor expandido.<sup>5</sup> El cambio morfológico de estado relajado al activo se debe a la fusión de las vesículas citoplasmáticas con la microvellosidades para formar microvellosidades elongadas de los canalículos secretores expandidos.<sup>4</sup> Una vez que la enzima se encuentra en el canalículo secreta ácido intercambiando hidronios citoplasmáticos por potasio extracelulares.<sup>3</sup>

La H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa bombea protones en contra de un gradiente de concentración 10<sup>6</sup> veces mayor, pues la concentración luminal de protones es de 150 mM.<sup>6</sup> Esto se realiza mediante un intercambio eléctricamente neutro de H<sup>+</sup> por K<sup>+</sup>, a través de la membrana de la célula parietal, mediado por hidrólisis de ATP.<sup>7</sup> Al igual que en todas las ATPasas tipo P, este transporte catiónico se consigue mediante cambios conformacionales cíclicos entre dos estado principales, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> junto con sus correspondientes intermediarios fosforilados (E<sub>1</sub>P y E<sub>2</sub>P), que son resultado de la auto-fosforilación reversible de un residuo de aspartato en el motivo invariante DKTGTLT.<sup>8</sup>

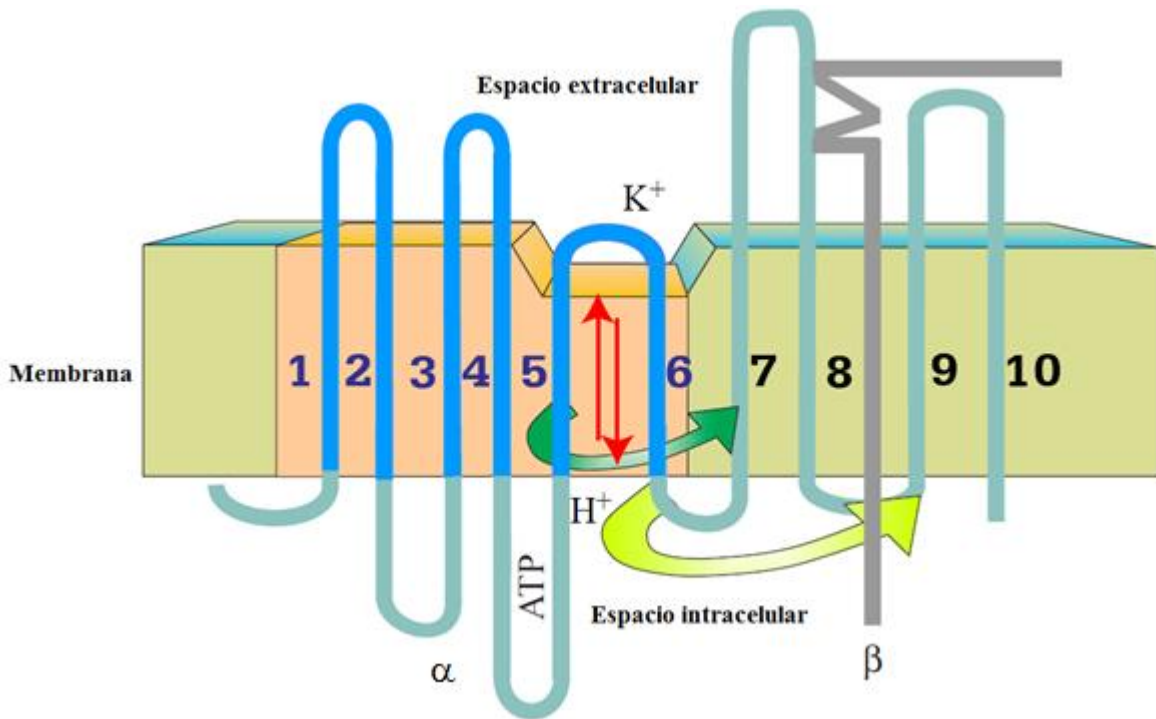
De acuerdo al esquema de reacción tipo Post-Albers<sup>9</sup> (ver **figura 2**) los estados E<sub>1</sub>, orientado al citoplasma, y E<sub>2</sub>, orientado al lumen, tienen gran afinidad por los cationes H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, respectivamente.<sup>3</sup> El cambio conformacional de E<sub>1</sub>P a E<sub>2</sub>P convierte el sitio de enlace catiónico de gran afinidad por H<sup>+</sup> y baja afinidad por K<sup>+</sup>, a un sitio de enlace con afinidades opuestas a las anteriores, permitiendo que la enzima libere el protón en el lumen estomacal e interactúe con el K<sup>+</sup> extracelular.<sup>10</sup> Durante el cambio conformacional de E<sub>1</sub>P a E<sub>2</sub>P los residuos que interactúan con el protón sufren grandes cambios de pKa que probablemente involucren el reacomodo de la lisina 791 en la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa de rata.<sup>11</sup>

Los protones son transportados hacia el lumen de la membrana en la transición de E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub>P con ayuda de ATP. Los cationes de K<sup>+</sup> activan la desfosforilación de E<sub>2</sub>P para formar E<sub>2</sub>K, ocluyendo al K<sup>+</sup>. Posteriormente, el K<sup>+</sup> es liberado en el citoplasma al completarse el cambio conformacional a E<sub>1</sub> de vuelta.



**Figura 2.** Esquema de reacción tipo Post-Albers de la  $H^+/K^+$  ATPasa

La  $H^+/K^+$  ATPasa es una enzima  $\alpha,\beta$ -heterodimérica que consiste en dos subunidades, una  $\alpha$  y otra  $\beta$ , (ver **figura 3**) y el ensamblado individual de bombas es un tetrámero de tipo  $(\alpha\beta)_4$  sobre la superficie de la célula parietal.<sup>12</sup> La subunidad  $\alpha$  catalítica es homóloga a otras subunidades  $\alpha$  de ATPasas de tipo P2<sup>13</sup>, como la  $Na^+/K^+$  ATPasa y la  $Ca^{2+}$  ATPasa. La  $H^+/K^+$  ATPasa se compone de diez hélices transmembranales (TM1-TM10), en las que se localizan los sitios de interacción de cationes, y tres dominios citoplasmáticos: el de unión del nucleótido (N), el de fosforilación (P) y el dominio actuador (A).<sup>14</sup> Tanto la  $H^+/K^+$  ATPasa como la  $Na^+/K^+$  ATPasa requieren de la subunidad  $\beta$  para la oclusión de  $K^+$ ,<sup>15 16</sup> la expresión funcional del complejo enzimático<sup>17</sup> y para bloquear la reversión del ciclo de transporte, estabilizando la conformación E2P con su amino terminal.<sup>18</sup>



**Figura 3.** Representación sencilla de la bomba de protones, con los 10 dominios transmembranales de la subunidad  $\alpha$  catalítica y el dominio transmembranal de la subunidad  $\beta$ .

La subunidad  $\alpha$  de la  $H^+/K^+$  ATPasa consta de 1033 residuos y es homóloga en 63% y 25% a las subunidades correspondientes en la  $Na^+/K^+$ ATPasa y  $Ca^{2+}$  ATPasa, respectivamente.<sup>19</sup> En esta subunidad catalítica existe un cluster de aminoácidos carboxílicos localizados en la mitad de los segmentos transmembranales TM4, TM5, TM6 y TM8 que contienen el dominio de interacción de cationes en esta enzima, en la  $Na^+/K^+$ ATPasa y  $Ca^{2+}$  ATPasa. En la  $H^+/K^+$  ATPasa también se encuentra la lisina 791 en el TM5 que reemplaza una serina en la  $Na^+/K^+$ ATPasa. Dicha lisina en la  $H^+/K^+$  ATPasa caracteriza la especificidad de esta enzima para el transporte al exterior de hidronio.<sup>3</sup>

La subunidad  $\beta$  está formada por 291 residuos y consta de seis o siete sitios de N-glicosilación. La  $H^+/K^+$  ATPasa es ensamblada en el retículo endoplásmico y liberada a la membrana apical como un oligómero heterodimérico. La N-glicosilación de esta subunidad es la responsable de su transporte hacia la membrana apical. Actualmente, no existe una estructura cristalina de alta resolución de la  $H^+/K^+$  ATPasa, por lo que no se conoce la localización exacta de la subunidad  $\beta$ .<sup>3</sup>

Está comprobado que en la  $H^+/K^+$  ATPasa y en la  $Na^+/K^+$ ATPasa existe una estabilización del estado E2P, pues existen interacciones transmembranales entre residuos del TM7 de la subunidad  $\alpha$  con dos tirosinas conservadas en la región transmembranal de la subunidad  $\beta$ .<sup>20</sup> La subunidad  $\beta$  previene que se presente una reversión en el transporte



iónico mediante un mecanismo tipo “ratchet”, que le permite a la  $H^+/K^+$  ATPasa bombear en contra del gradiente alto de protones.<sup>21</sup>

Tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta$ , comparten un grado significativo de homología con  $Na^+/K^+$  ATPasa.<sup>22,23</sup> Esta relación con otras ATPasas tipo P2 ha sido explotada ampliamente en el modelado de la  $H^+/K^+$  ATPasa tomando como modelo la estructura cristalina de la  $Ca^{2+}$  ATPasa, la cual ha sido obtenida en varios estados conformacionales.<sup>24,25,26</sup>

### 2.3. Inhibidores y antagonistas de la bomba de protones.

Se han desarrollado dos clases de fármacos que se unen específicamente a la cara superficial de la  $H^+/K^+$  ATPasa en su conformación E2. La primer clase corresponde a los inhibidores de la bomba de protones, que se encuentra actualmente en el mercado. Esta clase de fármacos corresponden a piridinilmetilsulfonilbenzimidazoles, por ejemplo: el lansoprazol, omeprazol y pantoprazol. Estos compuestos son profármacos que se acumulan en el espacio ácido del canalículo secretor y, posteriormente, se activan gracias a las condiciones ácidas para formar sus respectivos intermediarios catiónicos tiofílicos. Tales intermediarios pueden reaccionar con uno o más sulfidrilos de cisteínas en la superficie luminal de la bomba para formar enlaces disulfuro, lo cual estabiliza a la enzima en su conformación E2.<sup>27</sup>

La otra familia de fármacos corresponde a los antagonistas de la bomba de protones (APA acid pump antagonist) como el SCH28080, que actualmente se encuentra en desarrollo. Estas moléculas son inhibidores competitivos del  $K^+$  con una estructura base -imidazo[1,2-a] piridina.<sup>28,29</sup>

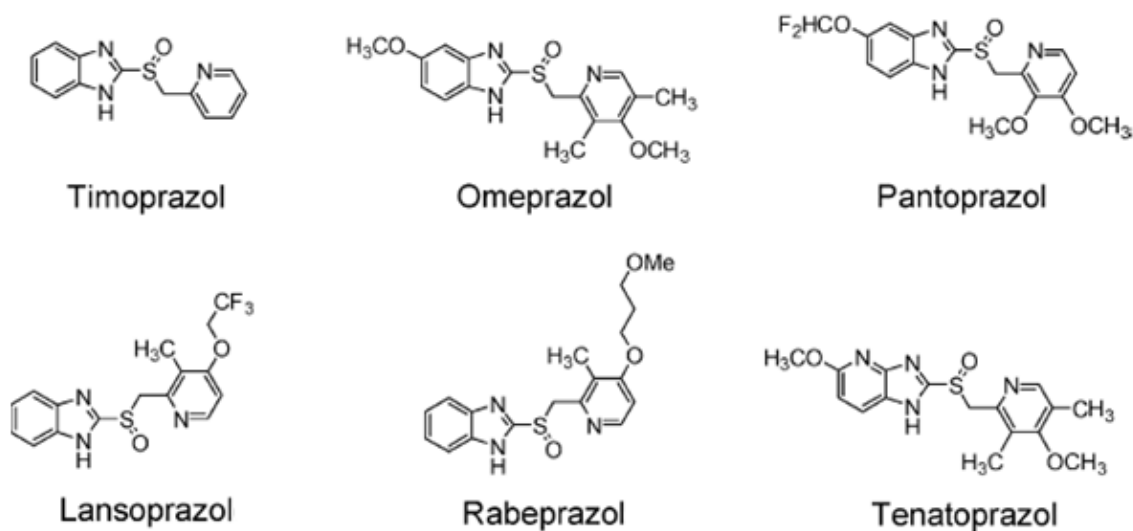
Después del descubrimiento del SCH28080, se han desarrollado numerosos análogos basándose en su estructura plana. Sin embargo, han carecido de eficacia en su uso clínico debido a una corta duración en la inhibición de la secreción de ácido, o a efectos adversos como hepatotoxicidad o el bloqueo del canal de  $K^+$  tipo hERG.<sup>30</sup>

Los PPIs están constituidos químicamente por dos partes heterocíclicas, una parte corresponde a un anillo de piridina y la otra es un bencimidazol o una imidazo-piridina. Estas dos partes heterocíclicas están unidas a través de un grupo metilsulfonilo ( $-CH_2SO-$ ).

El timoprazol fue el primer compuesto que inhibió la secreción de ácido gástrico en modelos *in vitro*, así como en glándulas gástricas de conejo *in vivo*, independientemente de la naturaleza de la estimulación de la bomba de protones. El pKa del anillo de piridina en el timoprazol es  $\sim 3.0$ , lo que le permite una acumulación selectiva en el espacio ácido de la célula parietal.<sup>31</sup> Este compuesto fue descubierto en 1975 por la compañía farmacéutica

suiza Hassle AB, por serendipia, en la búsqueda de algún fármaco útil en el tratamiento de la enfermedad de la úlcera péptica. Su mecanismo de acción no se conocía, pero produjo tirotoxicidad y timotoxicidad en ratas.<sup>32</sup> Posteriormente, se encontró que, en ausencia de secreción de ácido de la bomba de protones, el compuesto era inactivo, al igual que su sucesor el picoprazol, sintetizado en 1977. Sin embargo, cuando el transporte ácido de la bomba de protones estaba presente, ambos compuestos inhibieron la secreción de ácido gástrico, después de la fase lag.<sup>33</sup> Posteriormente, al examinar las estructuras de los compuestos y las características de su efecto inhibitor de la bomba de protones, se dedujo que ambos compuestos eran profármacos activados en condiciones ácidas.<sup>34</sup>

En 1989 fue comercializado el omeprazol y se convirtió en el primer fármaco inhibidor de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica. El omeprazol (Losec<sup>®</sup>) fue seguido por el lansoprazol (Prevacid<sup>®</sup>), pantoprazol (Protonix<sup>®</sup>), rabeprazol (Aciphex<sup>®</sup>) y, finalmente, por el enantiómero S del omeprazol (Nexium<sup>®</sup>). Toda esta familia de fármacos inhiben covalentemente a la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica y su efecto es mayor del esperado por sus niveles en sangre<sup>35</sup>. La estructura de algunos prazoles se muestra en la **figura 4**.



**Figura 4.** Estructura molecular de los prazoles.

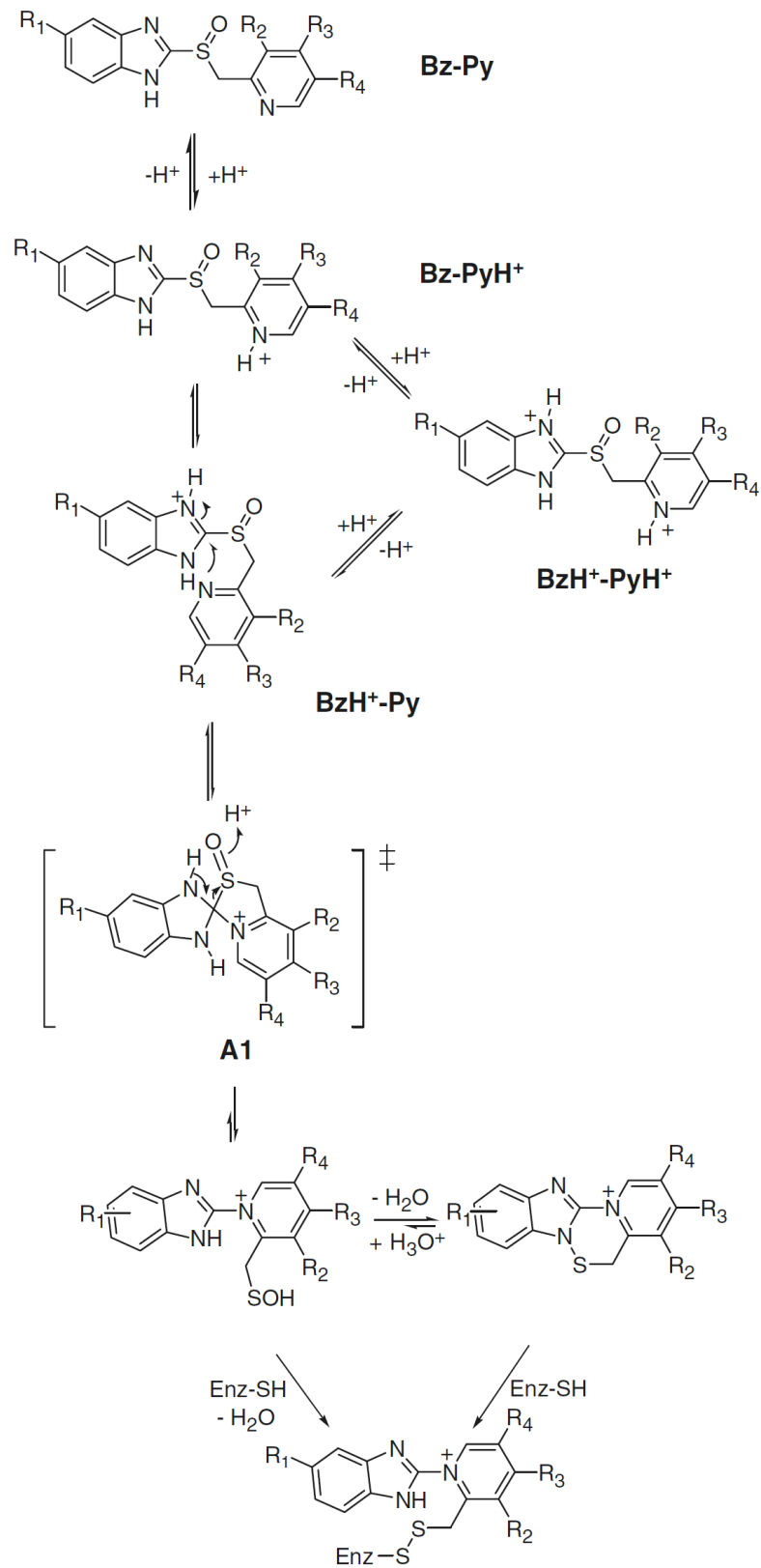
Esta familia de fármacos es, actualmente, la alternativa terapéutica de mayor uso para las enfermedades relacionadas a la secreción de ácido gástrico. Los inhibidores de la bomba de protones son activados en las condiciones ácidas que están presentes en el lumen de la célula parietal. Una vez activos, modifican mediante un enlace disulfuro los residuos de cisteínas localizados en la cara luminal de la bomba de protones, inhibiendo su actividad.<sup>36</sup>

Las células parietales corresponden al único espacio corporal que tiene un  $pH < 4.0$ , lo que permite una acumulación selectiva de bases débiles. Los PPIs son bases débiles con un  $pKa$  entre  $\sim 4.0$  (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol) y  $5.0$  (rabeprazol). Esta propiedad

hace que se acumulen en los canalículos secretores de la célula parietal estimulada. Esta concentración selectiva dependiente de las condiciones ácidas es la primera propiedad importante de los PPIs que determina su índice terapéutico, pues provoca una concentración en la superficie luminal alrededor de 1000 veces mayor a la que hay en la sangre. La segunda característica importante de los PPIs para su acción terapéutica es la conversión, dependiente de pH, del profármaco acumulado a sus especies activas, que corresponden a compuestos tiofílicos altamente reactivos. La protonación de estos compuestos es necesaria para su activación y la posibilidad de que puedan formar enlaces disulfuros con cisteínas de la bomba de protones.

La ruta de activación química de los PPIs se muestra en la **figura 5**. En la parte superior de esta figura se muestra la protonación del anillo de piridina para dar lugar a Bz-PyH<sup>+</sup> y, en la segunda fila, se muestran las estructuras de la protonación del anillo de bencimidazol (BzH<sup>+</sup>-Py y BzH<sup>+</sup>-PyH<sup>+</sup>). La forma diprotonada BzH<sup>+</sup>-PyH<sup>+</sup> está en equilibrio con la estructura del bencimidazol protonado y la piridina desprotonada BzH<sup>+</sup>-Py. Entre paréntesis cuadrados se muestra el estado de transición de la reacción del C2 del bencimidazol protonado con la fracción desprotonada de la piridina que da como resultado un compuesto espiro A1, que al reorganizarse da el ácido sulfénico tetracíclico catiónico que, a su vez, en solución acuosa se deshidrata para formar la sulfenamida catiónica.<sup>37</sup> Cualquiera de estas dos últimas especies catiónicas pueden reaccionar con la enzima para formar enlaces disulfuros con una o más cisteínas accesibles en la superficie luminal de la enzima.

Todos los PPIs reaccionan con la cisteína 813 en el asa que se encuentra entre el TM5 y TM6, mostrado en la **figura 3**, fijando la enzima en su conformación E2. El omeprazol reacciona con las cisteínas 813 y 892, siendo esta última periférica al dominio de transporte iónico.<sup>38</sup> El lansoprazol con las cisteínas 813 y 321, que se encuentra en el vestíbulo luminal.<sup>39</sup> Finalmente, el pantoprazol y tenatoprazol reaccionan con las cisteínas 813 y 822.<sup>40 41 42</sup> La reacción con la cisteína 822 aporta una propiedad especial a la enzima inhibida covalentemente, llamada irreversibilidad, ya que no es posible romper el enlace disulfuro formado entre esta cisteína y el PPI, mediante el uso de agentes reductores *in vitro* e *in vivo*.<sup>32</sup>



**Figura 5.** Mecanismo de activación de los PPIs<sup>4</sup>.

## 2.4. Métodos teóricos computacionales.

### 2.4.1. Métodos semiempíricos.<sup>43</sup>

Los métodos semiempíricos son aquellos que, a través de la conjunción de la teoría y datos experimentales determinados, permiten obtener expresiones aproximadas para reducir el número de integrales a calcular dentro de un método auto-consistente.

Un ejemplo de este tipo de métodos es PM6, que permite describir la formación de enlaces covalentes, cambios en la estructura electrónica de conformeros, sistemas moleculares complejos, efectos cooperativos, transferencia de carga y reacciones químicas, lo cual no es posible describir con mecánica molecular.

El método PM6 utiliza una base que desprecia la diferencial diatómica de traslape (NDDO), e incorpora el término de interacción diatómica núcleo-núcleo Viotyuk y la aproximación de Thiell del orbital d. Esto ha permitido la parametrización de 80 elementos y la reducción de error en los principales grupos funcionales.

Las limitaciones de este método son que carece de la habilidad para describir con exactitud interacciones no covalentes, particularmente la energía de dispersión y los enlaces de hidrógeno.<sup>44</sup>

### 2.4.2. Funcionales de la densidad.

La teoría del funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas más usadas actualmente dentro de la química computacional. La mayoría de los funcionales están parametrizados y ajustados a detalle, utilizando bases de datos experimentales. Estas bases de datos incluyen, por ejemplo, energías de atomización, potenciales de ionización, afinidades electrónicas, energías de isomerización, termoquímica de hidrocarburos, energías de enlaces de coordinación, frecuencias vibracionales, distancias de enlace, etc. Los funcionales M05-2X y M06-2X tienen un buen desempeño en aplicaciones de termoquímica, barreras energéticas, estados de transición e interacciones no covalente y fueron desarrollados por el grupo de investigación de Donald Truhlar<sup>45</sup> en 2006, son de tipo meta-GGA y meta-GGA híbridos y han sido validados con datos experimentales dando resultados muy satisfactorios en una amplia gama de problemas químicos. En la **figura 6** se prueban 12 funcionales conocidos utilizando tres bases de datos: TC177, DBH76 y NCIE53.<sup>46</sup> La primera consiste en datos experimentales termoquímicos para 177 compuestos, la segunda se refiere a 76 barreras energéticas y la tercera está formada por 53 energías de interacciones no covalentes. Los funcionales más adecuados para termoquímica y barreras energéticas son el M06-2X, M05-2X y el BMK.

Los mejores para interacciones no covalentes son el M05-2X y el M06. Un gran número de casos de estudio y ensayos a detalle sobre ventajas y desventajas de los funcionales de Truhlar se pueden consultar en la referencia 46.

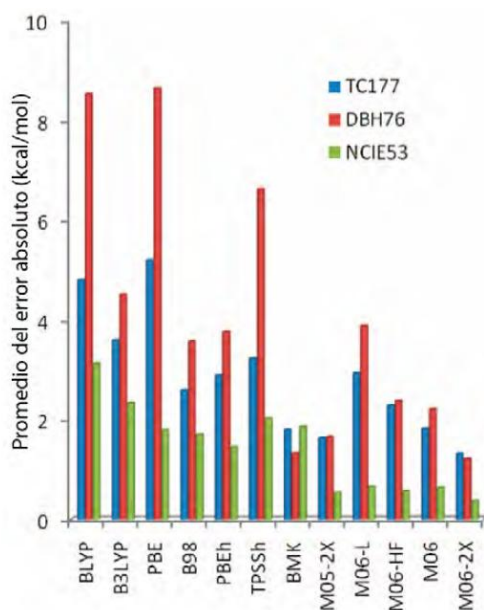


Figura 6. Promedio del error para diferentes funcionales en tres bases de datos.<sup>46</sup>

### 2.4.3. Átomos en moléculas.

La teoría de átomos en moléculas (AIM por sus siglas en inglés) fue desarrollada por el profesor Richard Bader en la Universidad de McMaster, Canadá.<sup>47</sup> Ha sido utilizada ampliamente para explicar muchos problemas químicos. Esta teoría es una aplicación de la química cuántica para un átomo en una molécula, donde la densidad electrónica  $\rho$  provee la información necesaria para describir las propiedades de un átomo. AIM define a un átomo dentro de una molécula en el espacio real, lo que permite extraer información química.

La densidad electrónica se obtiene a partir de la función de onda. En un arreglo de núcleos atómicos fijos, la probabilidad de encontrar uno de  $N$  electrones en el espacio está dada por:

$$\Psi^* (\mathbf{Q}) \Psi (\mathbf{Q}) d\mathbf{q}_1 d\mathbf{q}_2 \dots d\mathbf{q}_k \dots d\mathbf{q}_N \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $\mathbf{q}_k$  son las cuatro coordenadas que describen al electrón  $k$ , las tres coordenadas espaciales,  $\tau_k = (x_k, y_k, z_k)$  y la coordenada de spin,  $\sigma_k$  (que puede ser  $+1/2$  o  $-1/2$ ), entonces  $\mathbf{q}_k = (x_k, y_k, z_k, \sigma_k)$ . Se representan el total de la  $4N$  coordenadas con  $\mathbf{Q}$ , entonces  $\mathbf{Q} = (\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \dots, \mathbf{q}_N)$ . Siguiendo con esta notación, el volumen se puede denotar como  $d\tau_k = dx_k dy_k dz_k$ , que expresa la probabilidad de encontrar una configuración en la que cada

electrón está en una posición y spin determinado. Se puede simplificar esta idea sumando todas las coordenadas de spin e integrando en todos menos un electrón. No importa que electrón se deje fuera de la suma, pues todos los electrones son equivalentes. Por conveniencia, usamos el electrón 1 e integramos sobre todas las coordenadas de espín y las espaciales del electrón 2, del electrón 3, hasta el electrón  $N$ . La probabilidad de encontrar al electrón 1 dentro del volumen  $d\tau_1$ , está dada por:

$$\sum_{\text{spins}} \left[ \int d\tau_2 \int d\tau_3 \cdots \int d\tau_N \Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q}) \right] d\tau_1 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $\sum_{\text{spins}}$  es la suma de ambos spins de todos los electrones.

El total acumulado de la probabilidad de encontrar cualquiera de los  $N$  electrones en  $d\tau_1$  se obtiene multiplicando la Ecuación 4 por  $N$ . Esta cantidad corresponde al total de la probabilidad de encontrar carga electrónica en  $d\tau_1$ . El máximo valor que puede tener esta cantidad es  $N$ . Para obtener la densidad de probabilidad por unidad de volumen  $y$ , con esto, la densidad electrónica  $\rho$ , se emplea:

$$\rho(\mathbf{r}_1) = N \sum_{\text{spins}} \left[ \int d\tau_2 \int d\tau_3 \cdots \int d\tau_N \Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q}) \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

que se puede escribir de manera más concisa:

$$\rho(\mathbf{r})N \int d\tau' \Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q}) \quad \text{Ecuación 4}$$

donde  $\int d\tau'$  es la integración de todas las coordenadas de espín y las coordenadas espaciales de todos los electrones menos uno. La densidad electrónica presenta propiedades locales e integradas.

El Hessiano es la matriz de segundas derivadas de una función con respecto a todas las posibles combinaciones de coordenadas. Consideremos el Hessiano de la densidad electrónica, denotado por  $\nabla\nabla\rho$  y expresado explícitamente como se presenta en la **figura 7**:

$$\nabla\nabla\rho = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2\rho}{\partial x^2} & \frac{\partial^2\rho}{\partial x\partial y} & \frac{\partial^2\rho}{\partial x\partial z} \\ \frac{\partial^2\rho}{\partial y\partial x} & \frac{\partial^2\rho}{\partial y^2} & \frac{\partial^2\rho}{\partial y\partial z} \\ \frac{\partial^2\rho}{\partial z\partial x} & \frac{\partial^2\rho}{\partial z\partial y} & \frac{\partial^2\rho}{\partial z^2} \end{pmatrix}$$

**figura 7.** Hessiano de la densidad electrónica.

Esta matriz puede ser evaluada en cualquier punto del espacio pero nos enfocaremos en el  $\nabla\nabla\rho$  evaluado en el punto crítico de enlace BCP (por las siglas en inglés de bond critical point). Cada elemento de la matriz se interpreta como una curvatura. Adicionalmente, los valores de la matriz dependen de la elección del sistema de coordenadas (x,y,z). La estructura intrínseca o el perfil de  $\rho$  no depende de la elección del sistema de coordenadas. Para eliminar las arbitrariedades de la representación del Hessiano nos enfocamos en los valores propios y correspondientes vectores propios de  $\nabla\nabla\rho$  en un BCP determinado. Una propiedad muy conocida establece que los valores propios son invariantes con respecto a la rotación y, por lo tanto, son ideales para revelar la estructura interna del Hessiano. La ecuación del valor propio tiene tres soluciones, cada una de las cuales satisface la siguiente ecuación matricial:

$$(\nabla\nabla\rho) \mathbf{u}_i = \lambda_i \mathbf{u}_i \quad (i = 1,2,3) \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $\lambda_i$  es el valor propio *i*ésimo y  $\mathbf{u}_i$  es el vector propio correspondiente.

Los tres vectores propios son mutuamente ortogonales y coinciden con los llamados *ejes principales de la curvatura*. El Hessiano es una matriz diagonal cuando se expresa con respecto al sistema de ejes constituido por los ejes principales de la curvatura, por lo que cada vector propio representa un eje y el correspondiente valor propio determina el perfil de la densidad electrónica a lo largo de ese eje. Por ejemplo, si uno de los vectores propios en el punto crítico de enlace está direccionado a lo largo de la ruta de enlace y su valor propio asociado es positivo, esto implica que  $\rho$  es un mínimo a lo largo de la dirección de la ruta de enlace.

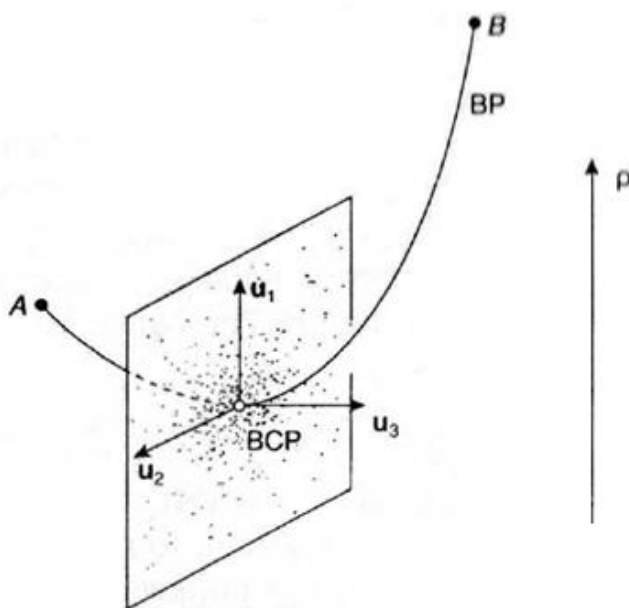
Los puntos críticos se clasifican de acuerdo a su espectro, el cual es el grupo de valores propios de la matriz del Hessiano  $\nabla\nabla\rho$ . El número de valores propios diferentes a cero y sus signos asociados son suficientes para definir el tipo de punto crítico. El *rango* de un punto crítico, denotado por  $r$ , es el número de valores propios diferentes a cero del espectro. La firma de un punto crítico, denotado por  $s$ , es un número que registra los tres signos de los valores propios del espectro. El número -1 se asigna a un valor propio negativo y +1 a un



positivo. Por ejemplo, en el punto crítico de enlace, el Hessiano posee un valor propio positivo y dos negativos y la marca es igual a  $(+1) + (-1) + (-1) = -1$ . El par ordenado de valores que caracteriza un punto crítico, rango y firma se expresan convenientemente como  $(r,s)$ , por lo que un punto crítico de enlace tiene los valores  $(3, -1)$ .

Según la teoría átomos en moléculas (AIM), dos átomos están enlazados si sus núcleos están vinculados a través de una ruta de enlace. Una ruta de enlace es una línea de interacción atómica en una molécula en una conformación de mínima energía. La colección de rutas de enlace, junto con la de puntos críticos de una molécula se denomina gráfica molecular.

El punto crítico de enlace (BCP), ver **figura 8**, es el punto de comunicación entre dos átomos, y los enlaces pueden ser caracterizados mediante propiedades evaluadas en tal punto crítico. Un criterio importante para detectar y caracterizar enlaces de hidrógeno según la teoría AIM es que el valor de  $\rho$  en el BCP esté dentro del rango  $(0.002, 0.04)$  u.a.



**Figura 8.** Representación de la estructura local del Hessiano en un BCP. Los dos vectores propios  $u_1$  y  $u_2$  generan un plano en el cual el BCP es un máximo como está marcado por la densidad de los puntos dispersados. Este plano es llamado un plano propio y es tangencial a la superficie interatómica. El vector propio restante  $u_3$  es tangencial a la ruta de enlace que comunica a los núcleos A y B. El punto crítico de enlace es un mínimo en esta dirección como lo muestra su posición con respecto al eje  $\rho$ .

La acumulación de carga entre los núcleos se incrementa con el orden de enlace. Un orden de enlace  $N$  puede ser definido utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \exp[A(r_b - B)] \quad \text{Ecuación 6}$$

donde A y B son constantes y esta expresión es útil para alrededor de veinte distintos enlaces CC. Una resolución típica da como resultado un orden de enlace de 1.6 para el enlace CC en el benceno. Este resultado es un valor intermedio entre el valor de Lewis de 1.50 y el valor del orbital molecular de Hückel de 1.67.

#### 2.4.4. Dinámica Molecular.

En simulaciones de dinámica molecular los átomos de un biopolímero se mueven de acuerdo a las ecuaciones de movimiento de Newton:

$$m_{\alpha} \ddot{\vec{r}}_{\alpha} = - \frac{\partial}{\partial \vec{r}_{\alpha}} U_{\text{total}}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N), \quad \alpha = 1, 2 \dots N, \quad \text{Ecuación 7}$$

donde  $m_{\alpha}$  es la masa del átomo  $\alpha$ ,  $r_{\alpha}$  es su posición y  $U_{\text{total}}$  es la energía potencial total que depende de todas las posiciones atómicas y acopla el movimiento de los átomos. La energía potencial, representada a través de los “campos de fuerza”, es la parte más importante de una simulación de dinámica molecular, debido a que debe representar de manera muy confiable la interacción entre átomos, aún cuando es propuesta de una forma simple mediante una función matemática que puede ser calculada rápidamente.

#### Funciones de campo de fuerza.

Para todas las simulaciones de dinámica molecular, que consideran el movimiento de cada uno de los átomos del sistema, se asume que cada átomo experimenta una fuerza especificada por un campo de fuerza modelo, que contiene todas las interacciones de ese átomo con el resto del sistema. Actualmente, los campos de fuerza tienen una buena relación entre la exactitud y la eficiencia computacional. NAMD emplea una función de energía potencial que posee las siguientes contribuciones:

$$U_{\text{total}} = U_{\text{enlace}} + U_{\text{ángulo}} + U_{\text{diedro}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{Coulomb}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Los primeros tres términos, del lado derecho de la ecuación 10 describen las interacciones de alargamiento, doblamiento y torsión de enlace.

$$U_{\text{enlace}} = \sum_{\text{enlace } i} k_i^{\text{enlace}} (r_i - r_{0i})^2, \quad \text{Ecuación 9}$$

$$U_{\text{ángulo}} = \sum_{\text{ángulo } i} k_i^{\text{ángulo}} (\theta_i - \theta_{0i})^2, \quad \text{Ecuación 10}$$

$$U_{\text{diedro}} = \sum_{\text{diedro } i} \begin{cases} k_i^{\text{diedro}} [1 + \cos(n_i\phi_i - \gamma_i)], & n_i \neq 0 \\ k_i^{\text{diedro}} (\theta_i - \gamma_i)^2, & n_i = 0 \end{cases} \quad \text{Ecuación 11}$$

donde enlace cuantifica cada enlace covalente en el sistema, ángulo son los ángulos entre cada par de enlaces covalentes que comparten un solo átomo en el vértice, y diedro describe los pares de átomos separados por exactamente tres enlaces covalentes con el enlace central sujeto al ángulo de torsión  $\phi$ . Los últimos dos términos en el lado derecho de la ecuación 10 describen las interacciones entre pares de átomos no enlazados y están dados por:

$$U_{\text{vdW}} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad \text{Ecuación 12}$$

$$U_{\text{Coulomb}} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}, \quad \text{Ecuación 13}$$

los cuales corresponden a interacciones de van der Waals (aproximadas mediante el potencial de Lennard-Jones) e interacciones electrostáticas.

Adicionalmente al potencial descrito mediante el campo de fuerza, NAMD también permite aplicar fuerzas externas al sistema. Estas fuerzas pueden ser utilizadas para guiar al sistema a configuraciones de interés. Los parámetros para las interacciones dadas en las ecuaciones 13 a 15 están especificados en los archivos de parámetros de los campos de fuerza para cada átomo en un ambiente molecular determinado. La determinación de esos parámetros es una tarea que se lleva a cabo generalmente a través de una combinación de técnicas empíricas con base en datos experimentales y cálculos mecanocuánticos.<sup>48 49 50</sup> Posteriormente, el campo de fuerza es probado en su capacidad para reproducir la estructura, dinámica y propiedades termodinámicas de moléculas pequeñas que han sido bien caracterizadas experimentalmente. NAMD es capaz de utilizar parametrizaciones de los campos de fuerza CHARMM<sup>50</sup> y AMBER.<sup>51</sup>

Para evitar efectos de superficie en la frontera de los sistemas simulados, se utilizan a menudo condiciones de frontera periódicas, donde las partículas están contenidas en una celda que es replicada infinitamente mediante trasposos periódicos. Una partícula que abandona la celda de un lado es reemplazada mediante una copia que entra al sistema del lado opuesto y cada partícula es sometida al potencial debido a las partículas, incluyendo las celdas circundantes, por lo que se eliminan completamente los efectos de superficie, más no los efectos de tamaño finito. Debido a que cada celda es una copia idéntica a las demás, todas las partículas se mueven juntas y necesitan ser representadas sólo una vez dentro del código de dinámica molecular.

## 2.5. Metodologías de análisis de dinámicas moleculares.

**RMSD** (root-mean-square deviation)<sup>52</sup>: Es una herramienta que compara cuantitativamente estructuras proteicas tridimensionales. Es una medida de la similitud de dos geometrías distintas de una proteína, que se define como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_i d_i^2}{n}}$$

Ecuación 14

donde  $d$  es la distancia entre cada uno de los  $n$  pares de átomos equivalentes en dos estructura superpuestas. El valor de este será de 0 cuando se presenten estructuras idénticas por consiguiente el valor de este irá incrementando a medida que las dos estructuras sean más distintas entres sí. Los valores de RMSD son considerados indicadores importantes de variabilidad cuando son comparados para proteínas muy similares, como podrían serlo conformaciones alternativas de una misma proteína. A partir de lo anterior es evidente que la comparación de valores de RMSD para proteínas con diferentes tamaños no tiene un significado claro, ya que el valor depende de los átomos involucrados en el alineamiento estructural.

**RMSF** (root- mean-square fluctuation)<sup>53</sup>: Es uno de los parámetros de similitud dinámica más usado en residuos alineados, contiene información de las amplitudes de fluctuación de un conjunto de átomos definido, como carbonos  $\alpha$ . Se calcula de la siguiente forma:

$$RMSF_i = \left[ \frac{1}{T} \sum_{tj=1}^T |r_i(tj) - r_i^{ref}|^2 \right]^{1/2}$$

Ecuación 15

donde  $T$  es el tiempo a lo largo del cual se quiere promediar y  $r_i^{ref}$  corresponde a la posición de referencia de la partícula  $i$ . Por lo regular, la posición de referencia es la posición promedio de la misma partícula.

**Radio de giro**: Es una medida de lo compacto de una estructura. Se calcula de la siguiente manera:

$$R_{gyr} = \left[ \frac{\sum_i r_i^2 m_i}{\sum_i m_i} \right]^2$$

Ecuación 16

donde  $m_i$  y  $r_i$  son la masa y la posición del átomo  $i$  con respecto al centro de masa de la molécula.

**ANOLEA**<sup>54</sup> (Atomic Non-Local Environment Assessment) es un programa que realiza cálculos de energía de cadenas proteicas, evaluando el ambiente no local (NLE por sus siglas en inglés) de cada átomo pesado en la molécula. La energía de cada interacción por pares en este ambiente no local, se toma de un potencial de fuerza medio, que se ha obtenido de una base de datos de 147 cadenas de proteínas no redundantes con una identidad de secuencia por debajo de 25% y resueltas mediante cristalografía de rayos X con una resolución menor a 3 Å. ANOLEA es utilizado para evaluar la calidad de plegamiento de los modelos proteicos. El eje “y”, de la gráfica que se obtiene, representa la energía de cada aminoácido de la cadena proteica. Los valores negativos representan energías favorables del medio, mientras que valores positivos, energías no favorables del medio para un aminoácido determinado.

**D-fire**<sup>55</sup> es un potencial estadístico, de tipo all-atom, basado en un estado de referencia de gas ideal finito. Se utiliza para evaluar interacciones atómicas de no enlace de un modelo proteico. Se obtiene una pseudo energía del modelo completo, que refleja su calidad y que puede ser utilizada para clasificar predicciones alternativas de una misma proteína. Una menor energía indica que un modelo está cercano a la conformación nativa de la proteína.

**Procheck**<sup>56</sup> es un grupo de programas que determina la calidad estereoquímica de una estructura proteica determinada. Su finalidad es evaluar que tan normal o inusual es la geometría de los residuos en una estructura proteica, en comparación a parámetros estereoquímicos derivados de estructuras de alta resolución.

**QMEAN** es una herramienta de evaluación estructural de proteínas, que se utiliza para la estimación global de la calidad de un modelo completo y para el análisis local por residuo de diferentes regiones dentro de un modelo proteico. La función de evaluación global QMEAN6<sup>57</sup> consiste en la combinación lineal de seis descriptores estructurales que utilizan potenciales estadísticos, que evalúan si un modelo tiene un plegamiento correcto. La geometría local es analizada mediante potenciales de ángulo de torsión de tres residuos consecutivos: se usan dos potenciales de interacción dependientes de distancia para evaluar interacciones de largo alcance. El primero es una implementación, a nivel residuo, basada en los átomos de carbono de tipo beta y el segundo es un potencial all-atom que evalúa más detalles del modelo. El potencial de solvatación investiga el grado de exposición de los residuos. Dos términos adicionales describen la concordancia de la estructura secundaria predicha por la secuencia y la estructura secundaria calculada, además de la accesibilidad del disolvente del modelo. Los rangos de la calidad estimada están entre 0 y 1 con valores altos para los mejores modelos.

Adicionalmente a los valores antes mencionados, QMEAN6 proporciona los valores Z compuestos, así como todos los términos que relacionan la calidad estimada con el puntaje obtenido para estructuras de referencia de alta resolución resueltas experimentalmente por cristalografía de rayos X. El puntaje Z-score representa una medida de la calidad absoluta de un modelo, proporcionando un estimado del grado de pertenencia de las características estructurales observadas en un modelo, describiendo la probabilidad de que un determinado modelo sea de calidad comparable a estructuras experimentales. Los modelos de baja calidad poseen valores de Z-score muy negativos. El análisis de los valores de Z-score de términos individuales puede ayudar a identificar las características geométricas responsables del un valor de Z-score negativo. Los valores promedio de Z de QMEAN son -0.58 para estructuras obtenidas mediante difracción de rayos X, -1.19 para RMN y -2.00 para microscopía electrónica. Sin embargo, existen valores de Z de QMEAN menores a -5 para cadenas de proteínas resueltas por cristalografía de rayos X, donde la mayoría corresponden a proteínas transmembranales o ribosomales.

## 2.6. Modelado de proteínas por homología.

El modelado de proteínas por homología es una herramienta computacional que se utiliza para predecir modelos de estructuras tridimensionales de proteínas, para obtener información sobre la estructura y función de éstas. Dentro de las estrategias para la predicción de estructuras se encuentran las siguientes:

El modelado de *novo*, que consiste en simular el plegamiento de una secuencia de aminoácidos a partir del uso de métodos estadísticos que predicen las conformaciones que pueden adoptar los residuos en una secuencia.

El modelo comparativo, que genera modelos a partir de estructuras resueltas experimentalmente, las cuales se utilizan como molde para predecir el plegamiento de una secuencia problema, basándose en el principio de que secuencias similares presentarán estructuras tridimensionales similares.<sup>58 59</sup> El procedimiento del modelado por homología consiste de manera general en los siguientes pasos:

- Tener una secuencia de aminoácidos problema.
- Identificación de una(s) estructura(s) tridimensional(es) conocida(s) relacionada a la secuencia problema para que sirva(n) como molde(s).
- Alineamiento de las secuencias problema y del molde.
- Construcción del modelo (backbone, asas, cadenas laterales) en base al alineamiento y la estructura del template.
- Refinamiento.
- Evaluación y validación del modelo generado.

### 3. Planteamiento del problema.

Este trabajo de tesis está motivado por dos situaciones:

1. El mecanismo reportado de activación farmacológica de los prazoles solamente está basado en suposiciones y no hay evidencia experimental del compuesto espiro.
2. A la fecha no hay un cristal de la  $H^+/K^+$  ATPasa, que sirva como modelo para diseñar fármacos que ayuden a regular la secreción de ácido gástrico, ni que explique los cambios estructurales en la bomba de protones gástrica humana, debidos a la presencia de enlaces disulfuro de un prazol con las cisteínas 813 o 822.

Debido a los dos puntos anteriores, en esta tesis se busca responder a las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es el mecanismo detallado de transformación profármaco-fármaco de los prazoles?
- ¿Cómo se lleva a cabo la formación del complejo, formado por una cisteína y la especie activa de los prazoles?
- ¿Qué características debe tener un modelo confiable de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana, para el diseño de fármacos?
- ¿Cuáles son los efectos globales y locales que los enlaces disulfuro entre el producto de la transposición de Smile del timoprazol con las cisteínas 813 y 822 producen en la estructura de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana?

### 4. Hipótesis.

El efecto farmacológico de los prazoles depende de tres factores: el proceso de bioactivación en medio ácido de los profármacos, la formación del enlace disulfuro entre la especie reactiva de cada prazol con las cisteínas 813 o 822 y, finalmente, el efecto que ejerce el enlace disulfuro prazol-cisteína en la estructura de la  $H^+/K^+$  ATPasa.

### 5. Objetivos.

#### 5.1. Mecanismo de activación de los prazoles:

- Determinar *in silico* el mecanismo de activación profármaco-fármaco de los prazoles reportados en la literatura.

## **5.2. Formación del enlace disulfuro entre la forma activa del timoprazol y una cisteína:**

- Determinar los factores involucrados en la formación del enlace disulfuro entre un prazol y una cisteína.

## **5.3. Modelado y dinámicas moleculares de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana:**

- Modelar la estructura tridimensional de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana y del complejo timoprazol-bomba de protones en las posiciones 813 y 822 y establecer el efecto de dichos complejos sobre la estructura de la proteína.

### **Objetivos particulares:**

- Insertar el modelo de la bomba de protones gástrica humana en una bicapa de fosfolípidos, solvatar y neutralizar el sistema completo y realizar una dinámica molecular.
- Sustituir la cisteínas 813 y 822, por separado, de la subunidad  $\alpha$  de la bomba de protones gástrica humana, por un enlace disulfuro entre la cisteína correspondiente con la molécula del activa del timoprazol, para determinar los efectos globales en la proteína debidos a la presencia del timoprazol en estas posiciones.

## **5.4. Estudio de los sitios reactivos de timoprazol en los sistemas 815 y 824:**

- Definir las interacciones entre el complejo covalente timoprazol-cisteína 815 y 824 con sus residuos cercanos en la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana.
- Determinar los cambios estructurales en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana, debidos a la modificación de las cisteínas 815 y 824.

## **6. Metodología:**

### **6.1. Mecanismo de activación de los prazoles.**

- Se determinaron los puntos de equilibrio estables (reactivos, productos e intermediarios) e inestables (estados de transición), con el programa GAUSSIAN 09<sup>60</sup> para elaborar el perfil energético del mecanismo de activación profármaco-fármaco de cada estructura del mecanismo de reacción reportado.



- Se realizó un análisis conformacional para encontrar la conformación reactiva de cada prazol reportado en la literatura.
- La búsqueda de puntos de equilibrio estables e inestables se llevó a cabo utilizando el funcional M06-2x y la base 6-31++G(d,p).<sup>46</sup>
- Los mínimos en la superficie potencial y los estados de transición fueron confirmados mediante un análisis de frecuencias a 298.15 K. Los intermediarios relacionados con un estado de transición se confirmaron mediante cálculos de coordenadas de reacción intrínseca
- Se incorporó el efecto de disolvente acuoso mediante la variante del formalismo de la ecuación integral del modelo de disolvente continuo polarizable utilizando el radio por defecto y el agua como disolvente.<sup>61</sup>

## **6.2. Formación del enlace disulfuro entre la forma activa del timoprazol y una cisteína.**

- Se determinaron los puntos de equilibrio estables (reactivos, productos e intermediarios) e inestables (estados de transición) para elaborar el perfil energético del mecanismo de formación del enlace disulfuro entre una cisteína y el timoprazol.
- La búsqueda de puntos de equilibrio estables e inestables se llevó a cabo utilizando el método PM6<sup>44</sup>.
- Los mínimos en la superficie potencial y los estados de transición fueron confirmados mediante un análisis de frecuencias a 298.15 K. Los intermediarios relacionados con un estado de transición se confirmaron mediante cálculos de coordenadas de reacción intrínseca

## **6.3. Modelado y dinámicas moleculares de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana.**

1.- Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)<sup>62</sup>, con la clave de acceso 1905895 para la subunidad  $\alpha$  de 1035 residuos y la clave 4557339 para la subunidad  $\beta$  de 291 residuos.

2.- Se realizó una revisión bibliográfica para determinar el mejor molde para hacer el modelado por homología de la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana y se encontró, en el Protein Data Bank (PDB), el cristal de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa de cerdo con una resolución de 3.5 Å en el archivo 3KDP. A partir del archivo anterior, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos

de las subunidades  $\alpha$  (998 residuos) y  $\beta$  (286 residuos) y se realizó en la página electrónica de Clustal W,<sup>63</sup> el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ambas subunidades de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana con las subunidades respectivas de la  $Na^+/K^+$  ATPasa de cerdo, con una matriz de identidad porcentual obtenida del programa Clustal 12.1.<sup>59</sup>

3.- A partir de la secuencia de aminoácidos de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana y el molde 3KDP de la  $Na^+/K^+$  ATPasa de cerdo, se modeló la estructura tridimensional de la bomba de protones humana con el programa Modeller 9v10.<sup>64</sup> Posteriormente, con el mismo programa, se optimizó el modelo con el mejor puntaje en el refinamiento de asas.

4.- El modelo proteico fue modificado con el programa VMD, adicionándole protones, insertándolo en una membrana de lípidos tipo POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), con una dimensión de 120 x 120 Å en los ejes x y y respectivamente. Se solvató con moléculas de agua tipo TIP3 y se adicionaron iones  $Cl^-$  y  $Na^+$  para neutralizar el sistema y fijar una concentración de 0.15 M. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM27 para obtener los parámetros geométricos correspondientes de todo el sistema, que abarca: la proteína, lípidos, iones y moléculas de agua.

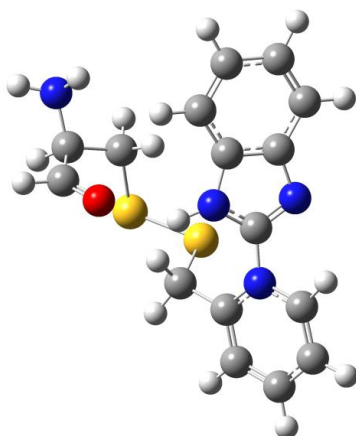
5.- La estructura tridimensional del modelo fue validada con las herramientas ANOLEA, QMEAN, D-fire y con el gráfico de Ramachandran.

6.- El modelo fue sometido a simulaciones de dinámica molecular utilizando el programa NAMD 2.6.<sup>65</sup> La simulación de dinámica molecular se realizó durante 50 ns. Ver **anexo 1** para los detalles del archivo de entrada para la dinámica molecular de equilibración.

7.- Se realizó un análisis de las dinámicas moleculares con el programa Carma<sup>66</sup>, para obtener los valores de RMSD, RMSF y radio de giro y, estudiar los movimientos estructurales del modelo y su grado de expansión.

- Se crearon los **sistemas 815 y 824** donde se modificaron las cisteína 815 y 824 del **sistema silvestre**, correspondientes a las cisteínas 813 y 822 reportadas en la literatura, por un enlace disulfuro de una cisteína con la molécula del timoprazol, para lo cual fue necesario construir el residuo **CYT**, que consistió en la molécula de una cisteína enlazada covalentemente a la molécula activa del timoprazol. Se obtuvieron los parámetros necesarios en la página de SwissParam,<sup>67</sup> para su inserción en la bomba de protones humana, sustituyendo la cisteína correspondiente, como se ilustra en la **figura 9**.

- Los parámetros geométricos de enlaces, ángulos y ángulos diedros de los átomos del residuo CYT se compararon con los equivalentes, obtenidos en un cristal correspondiente al enlace disulfuro del producto de la transposición de Smiles del omeprazol con  $\beta$ -mercaptoetanol y se realizó un análisis de  $\chi^2$  para establecer la similitud de los parámetros. Esto se describe a detalle en el **anexo 2**.



**Figura 9.** Residuo **CYT**, que consiste en una cisteína enlazada covalentemente con el producto de transposición de Smiles del timoprazol mediante un enlace disulfuro.

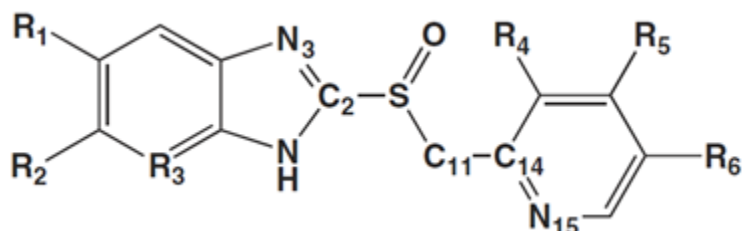
#### **6.4. Estudio de los sitios reactivos de timoprazol en los sistemas 815 y 824.**

- Se obtuvieron las estructuras representativas de los últimos 5 ns de simulación de los sistemas 815 y 824 con el programa Chimera 1.6.<sup>68</sup>
- Se hizo un recorte de los residuos más cercanos al aminoácido **CYT** en la posición 815 y 824 con el programa Discovery Studio 3.1.<sup>69</sup>
- A los recortes anteriores de cada sistema se les adicionaron hidrógenos en las posiciones de los residuos truncados con el programa GaussView y se realizó un cálculo single point con el programa GAUSSIAN 09 (Gaussian, Inc., Wallingford, CT)<sup>60</sup>.
- Se obtuvieron los puntos críticos de enlace con el programa AIMStudio,<sup>70</sup> de las interacciones interatómicas más importantes del residuo **CYT** con sus residuos circundantes en las posiciones 815 y 824.
- Se midieron las distancias de cada interacción determinada en el punto anterior a lo largo de los 50 ns de simulación para los sistemas 815 y 824 con el programa Carma.<sup>65</sup>

## 7. Resultados y análisis de resultados.

### 7.1. Mecanismo de activación de los prazoles.

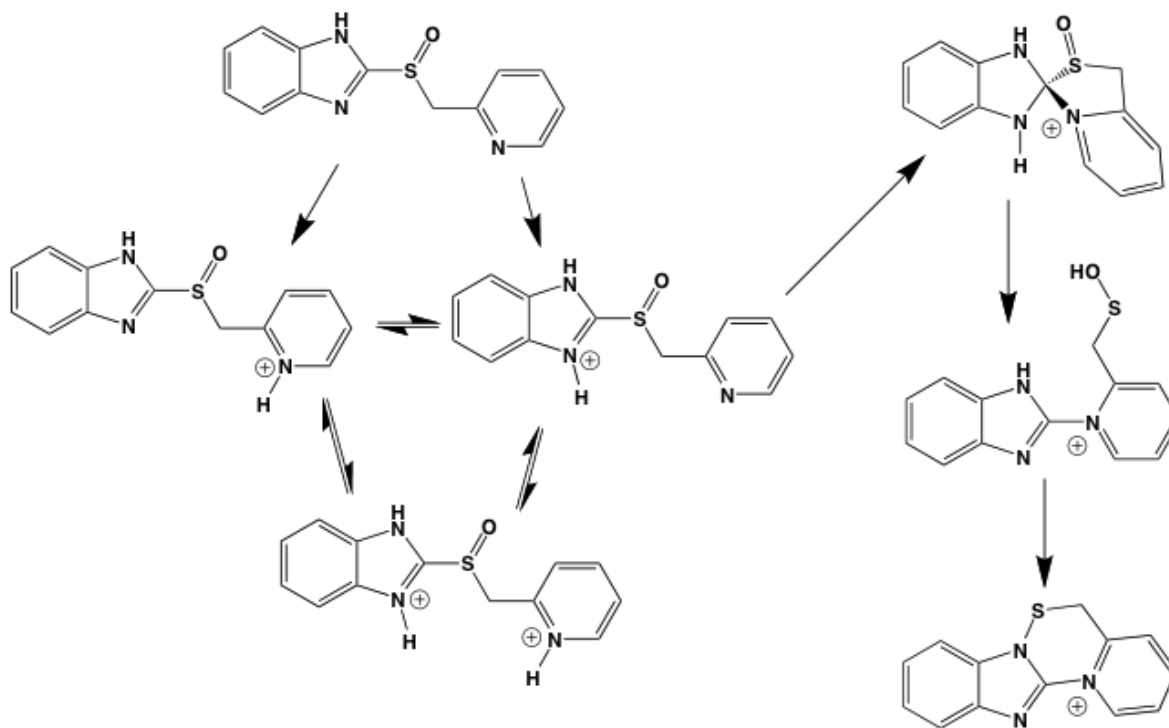
La **figura 10** presenta la estructura base de los prazoles estudiados.



Compuesto	Nombre comercial	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
1	Timoprazol	-H	-H	=CH	-H	-H	-H
2	Lansoprazol	-H	-H	=CH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	-H
3	Omeprazol	-H	-OCH <sub>3</sub>	=CH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
4	Pantoprazol	-H	-OCF <sub>3</sub>	=CH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
5	Picoprazol	-CH <sub>3</sub>	-COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	=CH	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
6	Rabeprazol	-H	-H	=CH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	-H
7	Tenatoprazol	-H	-OCH <sub>3</sub>	-N	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
8		-H	-H	=CH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H
9		-H	-H	=CH	-H	-OH	-H
10		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH	-H	-H	-H
11		-H	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H
12		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H
13		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-OH	-H
14		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H
15		-CF <sub>2</sub> H	-H	=CH	-H	-H	-H
16		-H	-H	=C-CF <sub>2</sub> H	-H	-H	-H
17		-CF <sub>2</sub> H	-H	=C-CF <sub>2</sub> H	-H	-H	-H

**Figura 10.** Estructura del timoprazol y sus análogos.

El mecanismo de activación de los prazoles que se estudió se presenta en la **figura 11** y se lleva a cabo mediante una transposición de Smiles.<sup>71 72 73 74</sup> La transposición de Smiles involucra la sustitución de un heteroátomo, vía una adición intramolecular y una eliminación, donde los grupos salientes en el segmento areno pueden ser O, S, SO o SO<sub>2</sub> o cualquier sustituyente capaz de remover la carga del grupo areno. Los nucleófilos pueden ser OH, SH, SO<sub>2</sub>H, NH<sub>2</sub> o el grupo NHacilo. La transposición de Smiles es catalizada normalmente en condiciones básicas pero también se han reportado en condiciones ácidas con calor<sup>75</sup>. Los átomos puente entre los grupos salientes y nucleófilos pueden ser saturados o estar incorporados a un anillo aromático.



**Figura 11.** Mecanismo de activación de los prazoles.

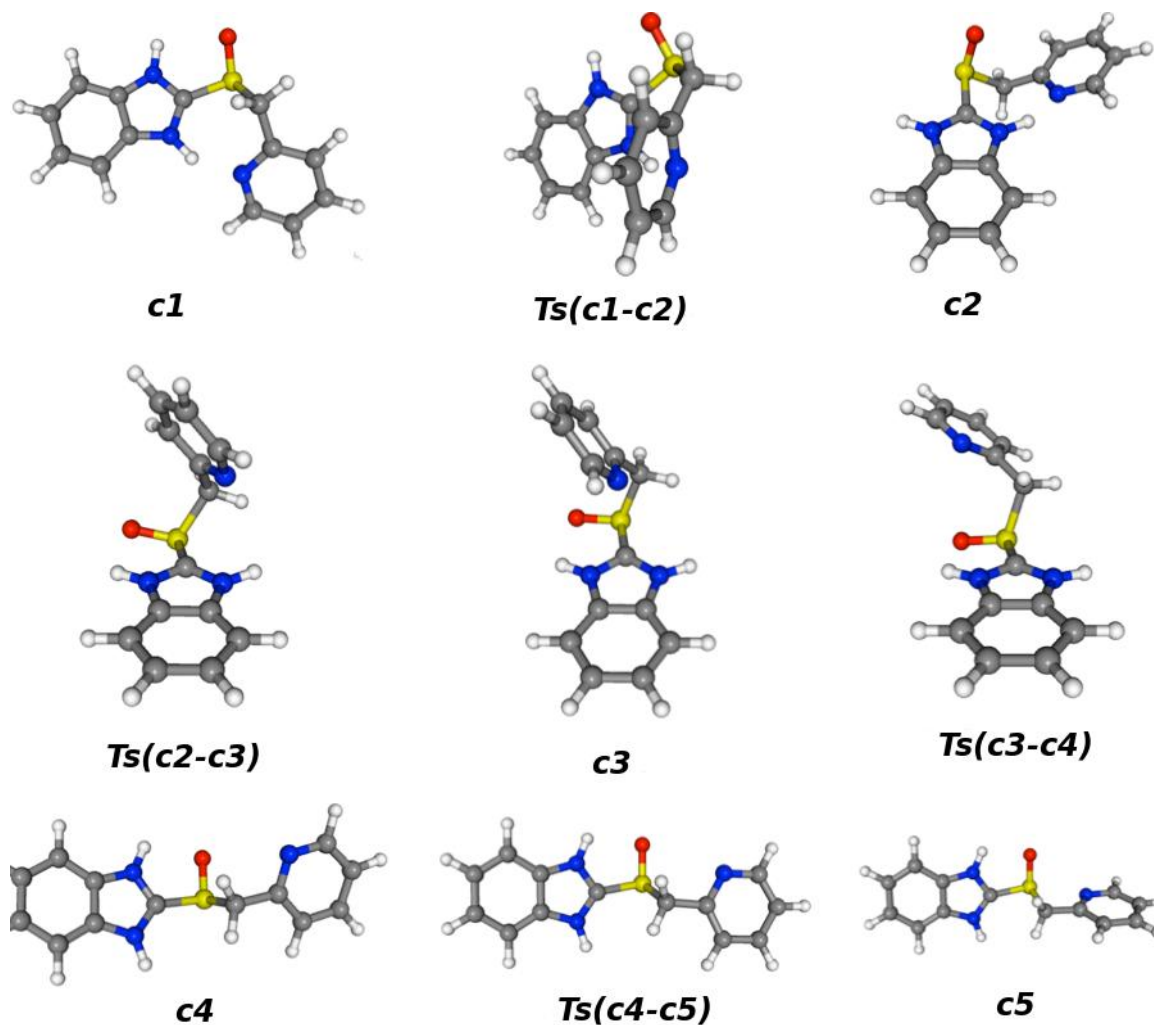
A un  $\text{pH} < 2$  existen tres equilibrios ácido-base entre los tres estados de protonación posibles de los prazoles: protonación del nitrógeno piridínico, del nitrógeno bencimidazólico, o ambas protonaciones. Una concentración pequeña del bencimidazol protonado permite que tenga lugar la transposición de Smiles debido al incremento en la electrofilicidad del átomo de carbono 2 (C2 en la **figura 10**) del anillo de bencimidazol. Así, el átomo de nitrógeno piridínico realiza un ataque nucleofílico sobre el C2 formando una estructura espiro tricíclica. Una eliminación posterior genera el ácido sulfénico correspondiente, que se transforma a una sulfenamida mediante una deshidratación, como se muestra en la **figura 11**. Tanto el ácido sulfénico, como la sulfenamida son especies tiofílicas capaces de reaccionar con la enzima formando un enlace disulfuro con cisteína específicas.<sup>76</sup>

La rapidez de conversión de los prazoles en su forma de ácidos sulfénicos depende directamente de la basicidad de su nitrógeno bencimidazólico,<sup>77</sup> lo cual determina la reactividad electrofílica del C2. En el proceso de activación, la concentración de prazol disminuye siguiendo una cinética de primer orden. También, se ha reportado que la rapidez en que el ácido sulfénico de los prazoles forma el enlace disulfuro está en función de la electrofilicidad del átomo de azufre.<sup>78</sup>

### 7.1.1. Análisis conformacional del timoprazol.

El análisis conformacional del timoprazol se realizó considerando los ángulos diedros de la cadena que une al anillo de piridina con el bencimidazol protonado del prazol. Se obtuvieron cinco geometrías conformacionales y sus respectivos estados de transición.

La **figura 12** presenta los isómeros conformacionales estables y estados de transición del timoprazol.

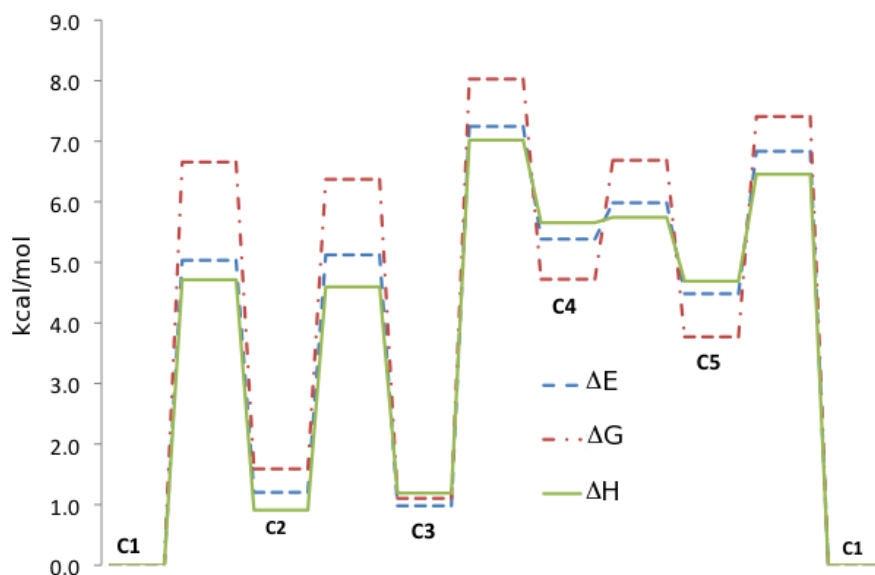


**Figura 12.** Conformeros estables del timoprazol y estados de transición correspondientes.

La **tabla 1** y la **figura 13** muestran las diferencias de energía total, energía libre de Gibbs y entalpía para los conformeros del timoprazol obtenidas

**Tabla 1.** Diferencias de energía electrónica, energía libre de Gibbs y entalpía de los conforméromos y estados de transición involucrados en el proceso de activación del timoprazol en Kcal/mol. Las energías están referidas a C1 de la **figura 14**.

Estructura	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta G$
c1	0.00	0.00	0.00
TS (c1-c2)	5.04	4.71	6.66
c2	1.20	0.91	1.59
TS (c2-c3)	5.12	4.60	6.37
c3	0.98	1.19	1.10
TS (c3-c4)	7.25	7.02	8.03
c4	5.38	5.66	4.72
TS (c4-c5)	5.98	5.74	6.69
c5	4.48	4.69	3.77
TS (c5-c1)	6.83	6.46	7.41
c3	0.98	1.19	1.10
TS (c3-S)	11.76	10.65	12.18
S	6.14	6.11	7.55
TS (S-SA)	13.10	10.79	13.01
SA	-9.99	-9.46	-9.44



**Figura 13.** Perfil energético del análisis conformacional del timoprazol. Las líneas azules corresponden a la energía electrónica, las rojas a la energía libre de Gibbs y las verdes, a la entalpía.

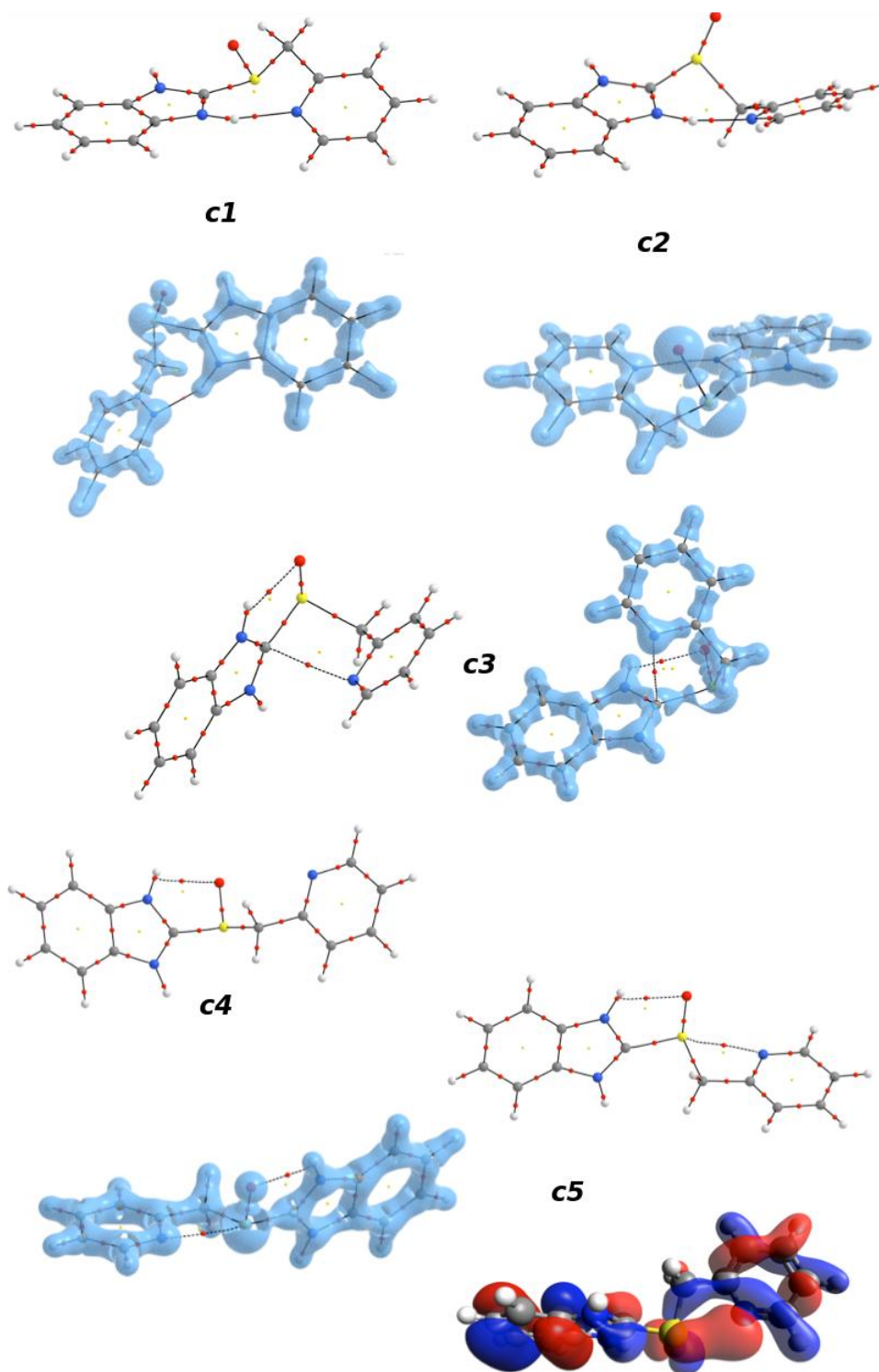
El conformero más estable es **c1** y se tomó como referencia para las diferencias energéticas. El conformero **c1** presenta el anillo de piridina en posición antiperiplanar al enlace S-O, con un ángulo diedro de 193.6°. Una rotación de 171.1° a lo largo del enlace S-O genera un conformero 1.59 Kcal/mol menos estable, el **c2**. La barrera energética entre **c1** y **c2** es de 6.66 Kcal/mol. **c3** es menos estable en 1.10 Kcal/mol que **c1**. **c3** posee el N15 del anillo de piridina dirigido hacia el carbono 2 del bencimidazol y se obtiene con una energía de activación **c2-c3** de 6.37 Kcal/mol. El estado de transición correspondiente muestra una reducción de 114° en el ángulo diedro a lo largo del enlace C2-S10, seguido de una reducción de 5.8° del ángulo diedro a lo largo del enlace C11-C14. Una rotación a lo largo del enlace S10-C11 de 119.7° da como resultado **c4**, un conformero extendido, 4.72 Kcal/mol menos estable que **c1**, tras superar una barrera energética **c3-c4** de 8.03 Kcal/mol. Una rotación a lo largo del enlace C11-C14 de 40.8° da **c5**, más estable que **c4** por 0.95 Kcal/mol. Oshishi *et al* (1989), Swamy y Ravikumar (2007) encontraron que **c4** es el conformero preferido del omeprazol neutro y de la sulfona del lansoprazol en estado sólido.<sup>79,80</sup> Existen dos rutas posibles desde **c1** para llegar a la conformación reactiva **c3**, **c1**→**c2**→**c3** y **c1**→**c5**→**c4**→**c3**. El paso determinante de rapidez (RDS por sus siglas en inglés), de la primer ruta es la barrera entre **c1** y **c2**, con  $\Delta G=6.7$  Kcal/mol, mientras que la RDS de la segunda ruta es la barrera entre **c1** a **c5**, con  $\Delta G=7.4$  Kcal/mol, por lo que la primera ruta es la más probable.

La **figura 14** muestra las gráficas moleculares<sup>81,82,83</sup> de los conformeros del timoprazol. En **c1** y **c2**, es posible observar un enlace de hidrógeno N-H···N con una distancia H···N de 1.854 y 1.643 Å, respectivamente. Esos enlaces de hidrógeno fueron caracterizados por un punto crítico de enlace.<sup>84</sup>

Las densidades electrónicas en el BCP (H···N) son 0.0400 y 0.0722 u.a. para **c1** y **c2** respectivamente. **c2** es menos estable que **c1** debido a la orientación de las concentraciones de carga no enlazantes (NBCC por sus siglas en inglés) del átomo de azufre, como se muestra en el laplaciano de la densidad electrónica<sup>85</sup> en la **figura 14**. Un par libre de electrones de átomos puede ser identificado con la NBCC como se define con el laplaciano de la densidad electrónica. En el caso de **c1**, el NBCC tiene la orientación adecuada para deslocalizarse con el anillo de bencimidazol, mientras que en **c2** no lo está. El valor de NBCC es una manera útil de medir la deslocalización de un par de electrones libre<sup>86</sup>. El valor del laplaciano de NBCC del azufre es 0.1817 y 0.1848 u.a. para **c1** y **c2** respectivamente, donde un valor pequeño se asocia a una mayor deslocalización. La deslocalización del par libre de electrones hacia el anillo de bencimidazol produce una disminución en la longitud del enlace C2-S10 de 0.087 Å en **c1**. A partir del laplaciano de **c3**, es posible observar una interacción de tipo donador-receptor entre el N15 del anillo de piridina y el C2 del bencimidazol, con una distancia de 2.9 Å y una  $\rho_{\text{bcp}}=0.0139$  u.a. Esta estructura **c3** corresponde a la conformación reactiva, que permite la transposición de Smiles. La conformación **c3** también presenta un enlace de hidrógeno entre el átomo de



hidrógeno del N1 protonado y el átomo de oxígeno del grupo S=O, con una distancia de 2.303 Å y una  $\rho_{\text{bcp}}=0.018$  u.a.

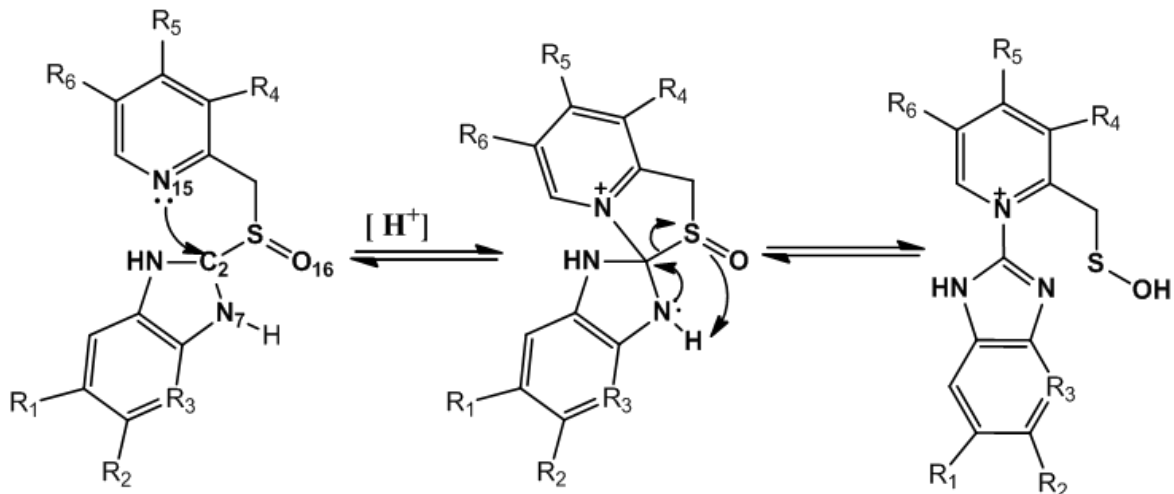


**Figura 14.** Gráficas moleculares y mapas de contorno del laplaciano de la densidad electrónica de los conformeros del timoprazol y orbitales HOMO y LUMO del conformero **c5**.

La gráfica molecular de **c5**, de la **figura 14**, presenta una interacción de tipo N $\cdots$ S, con una distancia N15-S10 de 2.819 Å y una  $\rho_{\text{bcp}} = 0.0244$  u.a. Hayashi *et al.* (2008) había sugerido previamente la existencia de una interacción N $\cdots$ S en el rabeprazol neutro, basándose en distancias cristalográficas<sup>87</sup>. Estos autores sintetizaron varios derivados del rabeprazol, que presentaron distancias N $\cdots$ S de alrededor de 2.7 - 2.8 Å. El mapa de laplaciano de **c5** en la **figura 14** puede ayudar a entender la interacción N $\cdots$ S. Alrededor del núcleo de azufre, es posible observar una NBCC relacionada al par libre de electrones del átomo de azufre y también una deficiencia de carga orientada hacia el NBCC del átomo de nitrógeno del anillo de piridina. La interacción N $\cdots$ S puede ser caracterizada como una de tipo donador-receptor<sup>88</sup> donde el átomo de azufre es el receptor. Esta interacción produce un conformero extendido ligeramente más estable que el otro conformero lineal **c4**. En la **figura 14**, también se muestra el orbital molecular relacionado a la interacción N $\cdots$ S. En resumen, el comportamiento conformacional del timoprazol puede ser explicado por la presencia de enlaces de hidrógeno, efectos estereoelectrónicos debido al par libre de electrones de los átomos de azufre e interacciones N $\cdots$ C y N $\cdots$ S de tipo donador-receptor.

### 7.1.2. Transposición de Smiles del timoprazol.

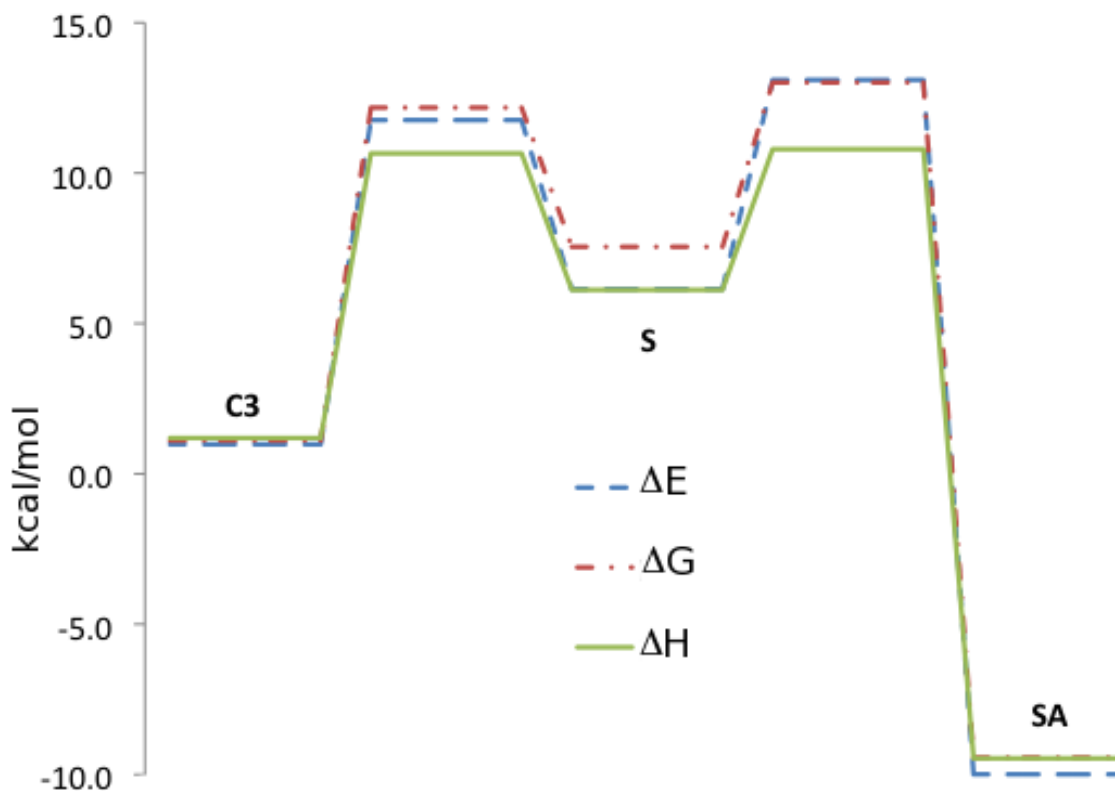
En la **figura 15** se puede observar la transposición de Smiles de los prazoles estudiados.



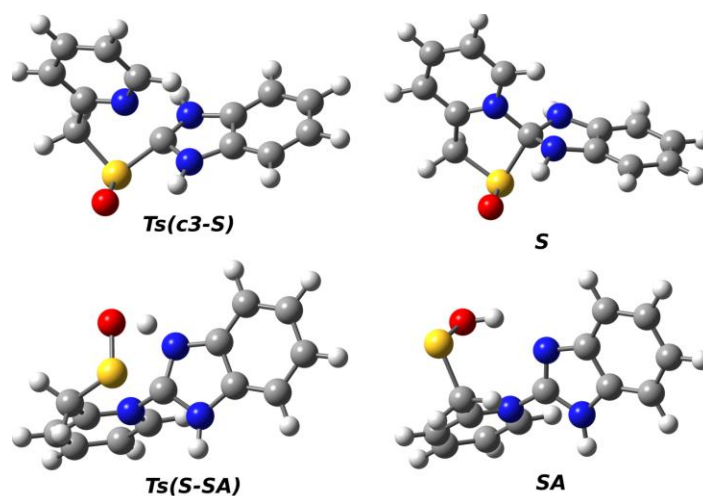
**Figura 15.** Transposición de Smiles de los prazoles estudiados. La primer molécula corresponde a la conformación reactiva que, en condiciones ácidas, da lugar al compuesto espiro y éste último se transforma al ácido sulfénico correspondiente.

En la segunda parte de la **tabla 1** y la **figura 16** muestran el perfil energético de la transposición de Smiles del timoprazol, el cual inicia con el ataque nucleofílico del nitrógeno del anillo de piridina sobre el C2 de benzimidazol en la conformación **c3**. Esta es una reacción endotérmica con una barrera energética de 12.18 Kcal/mol para dar un

compuesto espiro, **S**, que se muestra en la **figura 17**. Del conformero **c3** al estado de transición **TS(c3-S)**, la distancia N15-C2 se reduce a 1.91 Å, 71.6% del cambio de distancia en la reacción de adición. Después del estado de transición, se observa una reducción de 0.4 Å para dar una distancia final de N15-C2 de 1.51 Å en **S**.



**Figura 16.** Perfil energético de la transposición de Smiles en activación profármaco-fármaco del timoprazol.



**Figura 17.** Estructuras involucradas en la transposición de Smiles del timoprazol.

El segundo paso de la transposición de Smiles es una reacción concertada donde un protón migra desde el N7 hacia el átomo de O16, que va acompañada del rompimiento del enlace S10-C2 para producir el ácido sulfénico, **SA**, una forma activa de los prazoles, como se muestra en las **figuras 16** y **17**. El estado de transición del paso concertado es de 5.46 Kcal/mol por encima del compuesto espiro **S**. El producto **SA** es 9.44 Kcal/mol más estable que **c1**. La distancia S10-C2 se incrementa 1.81 Å de **S** a **SA**, y el alargamiento en el estado de transición es de 0.361 Å, 20% del cambio de distancia. En el **TS(S-SA)**, las distancias N-H y H-O están relacionadas, mientras que la distancia N-H se incrementa 0.12 Å (13.96%), la distancia H-O disminuye 0.83 Å (66.4%). En el mismo estado de transición, la distancia S-O y C-N solo cambian 0.06 Å (38.21%) y 0.05 Å (43.54 %), respectivamente.

### 7.1.3. Análisis conformacional de los prazoles sustituidos.

El análisis conformacional de los diecisiete prazoles estudiados (ver **figura 10**) se realizó en el mismo nivel de teoría, M06-2x y la base 6-31++G(d,p), encontrando los conformeros de cada uno, y etiquetándolos de la misma forma que se realizó con el timoprazol y se presentan en la **tabla 2**.

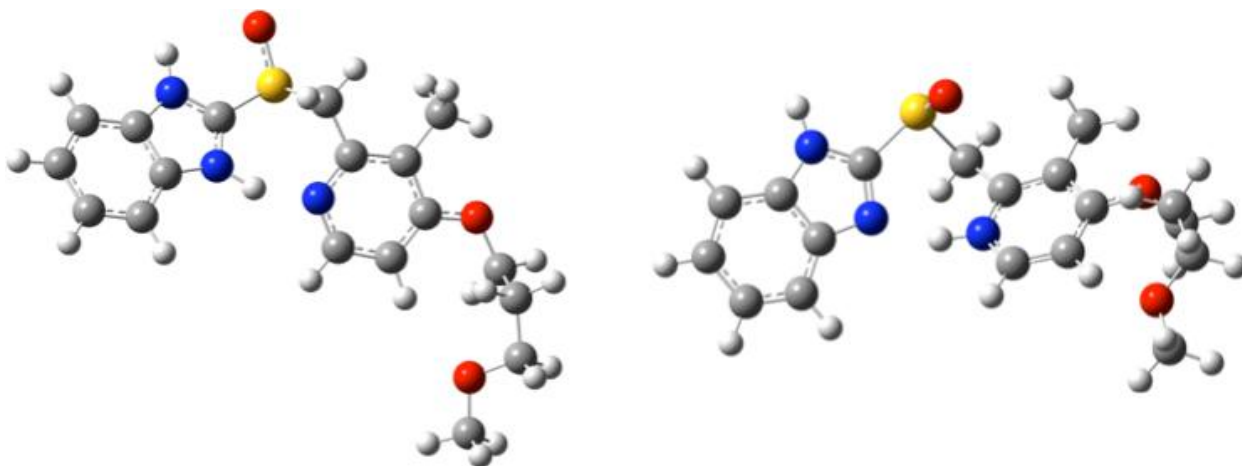
**Tabla 2.** Diferencias de energía electrónica y energía libre de Gibbs de los conformeros de los prazoles sustituidos, en Kcal/mol.

Estructura	c2		c3		c4		c5	
	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta E$	$\Delta G^a$
<b>1</b>	1.20	1.59	0.98	1.10	5.38	4.72	4.48	3.77
<b>2</b>	1.53	1.43	1.00	2.06	5.33	5.83	4.03	4.99
<b>3</b>	1.37	1.27	0.80	1.07	5.43	4.30	4.03	4.45
<b>4</b>	1.19	0.70	1.49	2.09	5.22	5.00	4.98	5.15
<b>5</b>	1.07	1.18	0.62	0.63	5.20	6.41	3.76	3.21
<b>6</b>	*	*	1.30	2.07	5.65	6.15	4.28	4.58
<b>7</b>	1.10	1.70	0.78	2.10	5.45	5.32	4.01	5.55
<b>8</b>	1.51	1.38	-0.16	0.75	4.26	3.56	3.51	2.75
<b>9</b>	1.13	1.56	1.26	2.43	5.79	5.52	4.84	4.72
<b>10</b>	*	*	1.35	2.47	6.03	6.33	5.04	4.86
<b>15</b>	1.16	2.43	0.98	2.85	5.53	6.04	4.77	5.48
<b>16</b>	1.28	1.51	1.61	2.12	6.35	6.83	5.63	4.94
<b>17</b>	1.14	1.93	1.88	2.96	6.57	7.93	5.69	6.38

a. Calculada a 298.15 K

En general, todos los prazoles tienen el mismo comportamiento del timoprazol y presentan al conformero **c1** como el más estable, excepto el prazol 8. Por otra parte, los conformeros **c2**, **c3**, **c4** y **c5** son en promedio, 1.5, 1.9, 5.7 y 4.7 Kcal/mol menos estables que **c1**, respectivamente. Los sustituyentes electroattractores en la parte del bencimidazol desestabilizan la conformación reactiva **c3**, mientras que el mismo tipo de sustituyentes en el anillo de piridina la estabilizan.

Algunos prazoles presentan la migración de un protón de la parte del bencimidazol hacia el anillo de piridina. Los conformeros **c2** esperados para el rabeprazol (**figura 18**) y el prazol 10 no se observaron debido a tal migración. En el caso de los prazoles 11 a 14, **c1** y **c2** convergieron en un solo conformero con la piridina protonada. La migración del protón se observó con sustituyentes electroattractores fuertes en la parte del bencimidazol y/o con grupos electrodonadores buenos en el anillo de piridina.



**Figura 18.** Migración del protón del bencimidazol hacia el anillo de piridina del rabeprazol.

#### 7.1.4. Transposición de Smiles de los prazoles sustituidos.

Las **tablas 3** y **4** presentan las diferencias de energía electrónica, libre de Gibbs y entalpía de cada barrera de la transposición de Smiles de los prazoles sustituidos, con el conformero **c3** de referencia, debido a que el conformero más estable no es el mismo para todos los prazoles.

**Tabla 3.** Diferencias de energía electrónica, energía libre de Gibbs y entalpía de la barrera c3-S, en Kcal/mol y diferencias de poblaciones electrónicas, en electrones, entre C2-N15 de todos los prazoles estudiados.

Estructura	$\Delta E$	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta N(C2-N15)$
1	10.8	11.1	9.5	3.417
2	9.7	9.2	8.3	3.429
3	10.8	11.4	9.7	3.429
4	9.6	9.4	8.2	3.426
5	8.6	9.5	7.5	3.430
6	10.1	9.4	8.5	3.434
7	10.4	10.3	9.3	3.420
8	15.2	14.2	13.5	3.386
9	10.2	10.4	8.9	3.420
10	7.6	8.3	6.5	3.429
11	7.6	8.2	6.5	3.424
12	5.0	6.7	4.0	3.441
13	4.5	5.8	3.8	3.447
14	4.6	5.6	3.5	3.446
15	9.8	10.1	8.6	3.420
16	9.4	10.4	8.3	3.420
17	8.3	9.2	7.3	3.424

**Tabla 4.** Diferencias de energía electrónica, energía libre de Gibbs y entalpía de la barrera S-SA, en Kcal/mol y poblaciones electrónicas, en electrones, del átomo de azufre de todos los prazoles estudiados.

Estructura	$\Delta E$	$\Delta G$	$\Delta H$	N(S)
1	6.96	5.46	4.68	14.75
2	7.05	5.32	5.28	14.76
3	6.71	6.04	4.57	14.77
4	6.79	5.14	4.36	14.76
5	7.77	6.52	5.17	14.74
7	6.65	5.56	4.38	14.76
8	7.43	5.88	4.99	14.73
9	6.60	5.01	4.37	14.77
10	8.02	5.64	5.16	14.73
11	8.13	6.79	5.53	14.72
12	8.84	6.77	5.90	14.70
13	8.75	6.74	5.94	14.71
14	8.69	7.05	5.92	14.71
15	7.28	5.82	4.81	14.75
16	7.48	6.08	4.92	14.74
17	7.83	6.09	5.17	14.73

En general la primera barrera de la transposición de Smiles es el paso determinante de la reacción, excepto para **12**, **13** y **14**, cuya segunda energía de activación ( $E_a$ ) es mayor que la primera por 1.90, 2.14, y 2.42 Kcal/mol, respectivamente. Para **11** y **12**, ambas  $E_a$  son cercanas. Los cambios energéticos durante la reacción de activación están modulados por la sustitución de los anillos. Grupos electrodonadores en la piridina y grupos electroattractores en el bencimidazol promueven el ataque de adición de N15 a C2, mientras que grupos electroattractores en la piridina y electrodonadores en el bencimidazol reducen la posibilidad de ataque. Los prazoles comerciales tiene la primer  $E_a$  (**c3-S**), reportada en la **tabla 3**, cercana a 8.7 Kcal/mol, sólo 0.8 Kcal/mol menor que la barrera del timoprazol. El mayor valor de  $\Delta H$  de **c3-S** lo tiene el compuesto **8**, que posee al grupo  $-\text{NO}_2$ , lo que dificulta el ataque nucleofílico por 4.0 Kcal/mol, con respecto al compuesto **1**. Los compuestos **13** y **14**, que poseen un grupo electrodonador  $-\text{OR}$  en el anillo de piridina y dos grupos  $-\text{NO}_2$  en el bencimidazol, presentan la menor  $E_a$ , 5.7 y 6.0 Kcal/mol menores que el timoprazol, respectivamente. Es evidente que un grupo electrodonador en la piridina disminuye la barrera en 0.58 Kcal/mol, mientras que un grupo electrotractor la incrementa en 4.30 Kcal/mol. Un grupo  $-\text{NO}_2$  en  $R_1$  y  $R_3$  disminuye el  $\Delta H(\text{c3-S})$  en 2.9 Kcal/mol, mientras que un grupo nitro en ambas posiciones da una barrera 5.5 Kcal/mol menor que en el timoprazol; el efecto atractor del grupo  $-\text{NO}_2$  en las posiciones  $R_1$  y  $R_3$  no es aditivo. En general, el compuesto espiro **S** es menos estable que **c3** por 3.05 Kcal/mol, excepto para las moléculas 10 a 14, donde el grupo nitro estabiliza el enlace C2-N15. En promedio los prazoles 10-14 son 4.8 Kcal/mol más estables que **c3**. En el caso de la segunda barrera (**S-SA**), teniendo a **S** como referencia, las energías de activación más grandes corresponden a los prazoles con grupos  $-\text{NO}_2$  en el bencimidazol, mientras que las barreras menores están asociadas a los prazoles con un grupo  $-\text{OR}$  en la parte de la piridina, como es el caso de los prazoles comerciales.

#### 7.1.5. Correlaciones.

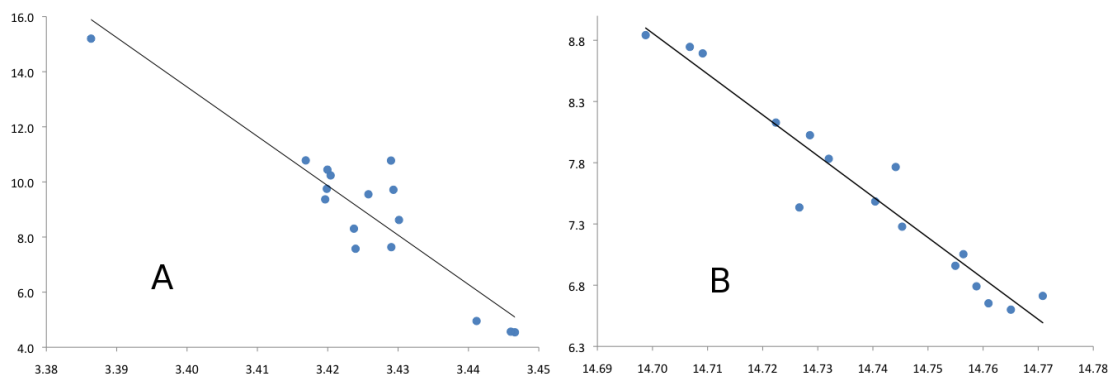
Menger *et al.* (2003) encontraron que las energías de activación para cuatro transposiciones de Smiles varían con la distancia al cuadrado entre los átomos nucleofílicos y electrofílicos.<sup>89</sup> En este caso, reportamos una relación entre las poblaciones atómicas de los átomos involucrados en la transposición de Smiles y las barreras energéticas de reacción, como un índice de reactividad útil para el ataque nucleofílico intramolecular en prazoles. Es posible calcular la población electrónica de cada átomo dentro de una región definida por el gradiente de la densidad electrónica.<sup>90</sup> La diferencia entre la población electrónica ( $\Delta N$ ) de un átomo nucleófilo (N15) y un átomo electrófilo (C2) se puede relacionar con  $\Delta E$ ,  $\Delta G$  y  $\Delta H$  del primer paso de la transposición de Smiles mediante las ecuaciones:

$$\Delta E = -171.35 \Delta N + 596.01 \quad \text{Ecuación 17}$$

$$\Delta G = -138.76 \Delta N + 484.77 \quad \text{Ecuación 18}$$

$$\Delta H = -160.53 \Delta N + 557.72 \quad \text{Ecuación 19}$$

con  $R^2=0.85$ . De las **figuras 19 A y B**, en la A se puede observar la tendencia de que un  $\Delta N$  pequeño da como resultado barreras mayores y viceversa, con un error de 1.26 Kcal/mol, mientras que en la figura B observa una mejor correlación, con un error de 0.21 Kcal/mol. Los detalles de la regresión de ambas graficas se presentan en el **anexo 3**.



**Figura 19.** (A) Correlación entre la diferencia de población electrónica  $\Delta N=N(N15)-N(C2)$  con la barrera energética del primer paso de la transposición de Smiles. (B) Correlación entre  $N(S)$  con la barrera del segundo paso de la transposición de Smiles. La energía y población electrónica se reportan en Kcal/mol y electrones.

La población electrónica del átomo de azufre,  $N(S)$ , puede ser relacionada con  $\Delta E$  y  $\Delta H$  del segundo paso de la reacción de activación mediante las ecuaciones:

$$\Delta E = -33.393 \Delta N + 499.74 \quad \text{Ecuación 20}$$

$$\Delta H = -22.203 \Delta N + 332.31 \quad \text{Ecuación 21}$$

con una  $R^2=0.93$ . La presencia de grupos electrodonadores en el anillo de piridina provoca distancias C2-S mayores, mayor  $N(S)$  y barreras pequeñas.

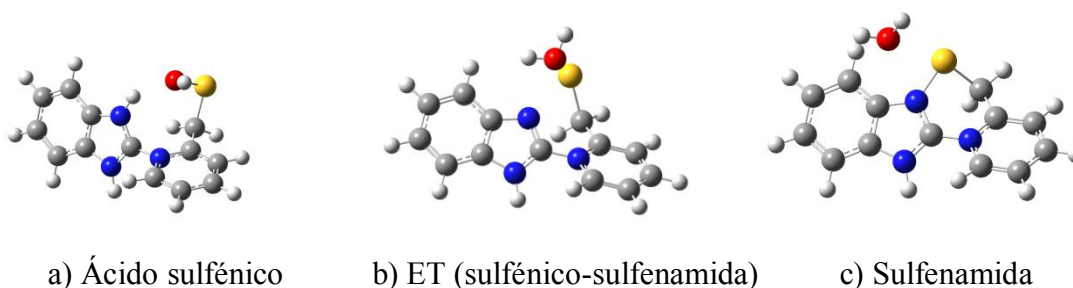
Ife *et al.* (1970) encontraron que no existe una relación simple entre la basicidad de la piridina, estabilidad y actividad biológica *in vivo*.<sup>91</sup> El grado de nucleofilicidad del átomo de nitrógeno en la piridina, más que su basicidad, denota la facilidad de la formación intermediaria del compuesto espiro. Por otro lado, Suschitzky y Wellsin (2005) reportaron que la sustitución en el anillo de bencimidazol no cambia la actividad en gran medida. Además, la introducción de sustituyentes electroattractores como  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{SOMe}$  y  $-\text{CF}_3$ , que poseen las barreras de activación menores, provocan una disminución en la potencia de



inhibición de la bomba de protones.<sup>92</sup> La biodisponibilidad está determinada por la transformación química de prazol hacia el ácido sulfénico, pero la inhibición de la bomba está controlada por interacciones específicas entre la molécula activa y el medio que rodea a la cisteína en la cual se enlaza.

## 7.2. Formación del enlace disulfuro entre la forma activa del timoprazol y una cisteína.

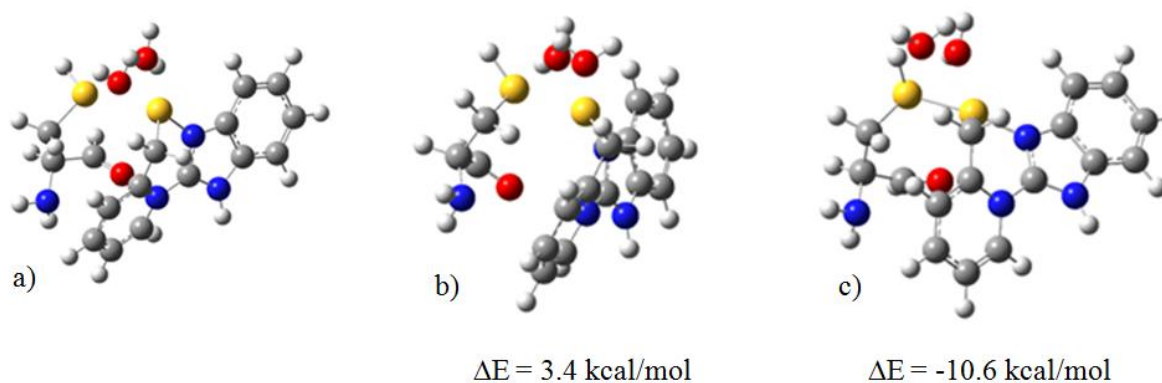
Tomando en cuenta que los prazoles son activos en condiciones ácidas, presentes en las células parietales del estómago (pH ~ 2), con la protonación del nitrógeno del bencimidazol fue posible encontrar la formación de la sulfenamida, con su respectivo estado de transición con el método M06-2x 6-31++G(d,p) y el modelo de solvatación iefpcm, ver **figura 20**. La barrera del paso del ácido sulfénico hacia la sulfenamida es de 55.1 Kcal/mol. La formación de la sulfenamida obtenida se da mediante el ataque del par libre de electrones del nitrógeno del bencimidazol sobre el átomo de azufre, con la liberación de una molécula de agua de manera concertada. El valor de la barrera energética obtenida es demasiado grande como para considerar factible la reacción de esta manera y hace necesario considerar efectos adicionales que la disminuya pudieran favorecerla en estudios posteriores.



**Figura 20.** Estructuras del ácido sulfénico, sulfenamida y el correspondiente estado de transición del timoprazol.

Por otra parte, Bayse (2011) utilizó la teoría del funcional de la densidad y el intercambio de protones asistido por disolvente (SAPE, por sus siglas en inglés), para estudiar estados de transición del proceso de reducción de cisteínas y la formación de enlaces disulfuro<sup>93</sup>. Bayse (2011) usó como reactivos una cisteína y la forma de ácido sulfénico de otra, rodeadas de cuatro moléculas de agua, obteniendo un estado de transición con una barrera energética de 12.5 Kcal/mol y como productos de la reacción se generaron el enlace disulfuro entre las dos cisteínas, más una molécula de agua. En base a lo anterior, se propusieron los sistemas que se presentan en la **figura 21**, para obtener la formación del enlace disulfuro entre una cisteína y el timoprazol en su forma de sulfenamida. Se calculó una barrera energética de 3.4 Kcal/mol con el método PM6, por lo que la presencia

explícita de moléculas de agua es necesaria para que se lleve a cabo la formación del enlace disulfuro entre la el timoprazol, en su forma de sulfenamida, con una molécula de cisteína.



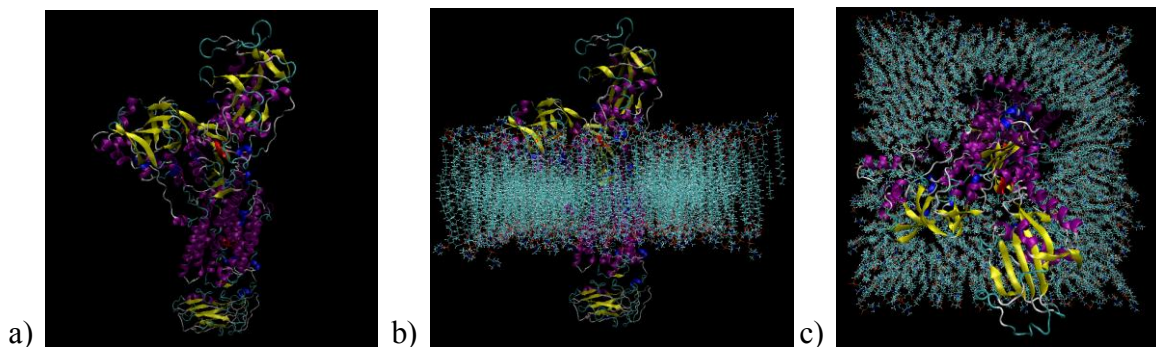
**Figura 21.** Fases de la formación del enlace disulfuro entre una cisteína y el timoprazol. a) Reactivos: cisteína, dos moléculas de agua y sulfenamida, b) Estado de transición, c) Productos: Enlace disulfuro protonado entre la cisteína y el timoprazol y dos moléculas de agua. El método de cálculo utilizado fue PM6.

### 7.3. Modelado y dinámicas moleculares de la $H^+/K^+$ ATPasa gástrica humana.

#### 7.3.1. Modelado y dinámica molecular del sistema silvestre.

Se construyó un modelo tridimensional de la proteína  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana mediante la técnica de modelado por homología. Se partió de la secuencia de aminoácidos de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana y el molde 3KDP del Protein Data Bank, que corresponde a un cristal de 3.5 Å de resolución, de la enzima  $Na^+/K^+$  ATPasa de cerdo, homóloga a la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana.

En la **figura 22** se observan tres representaciones del modelo obtenido de la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana, constituida por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , insertadas en una membrana lipídica, en un ambiente acuoso y neutro, que ahora en adelante denominaremos “sistema silvestre”.

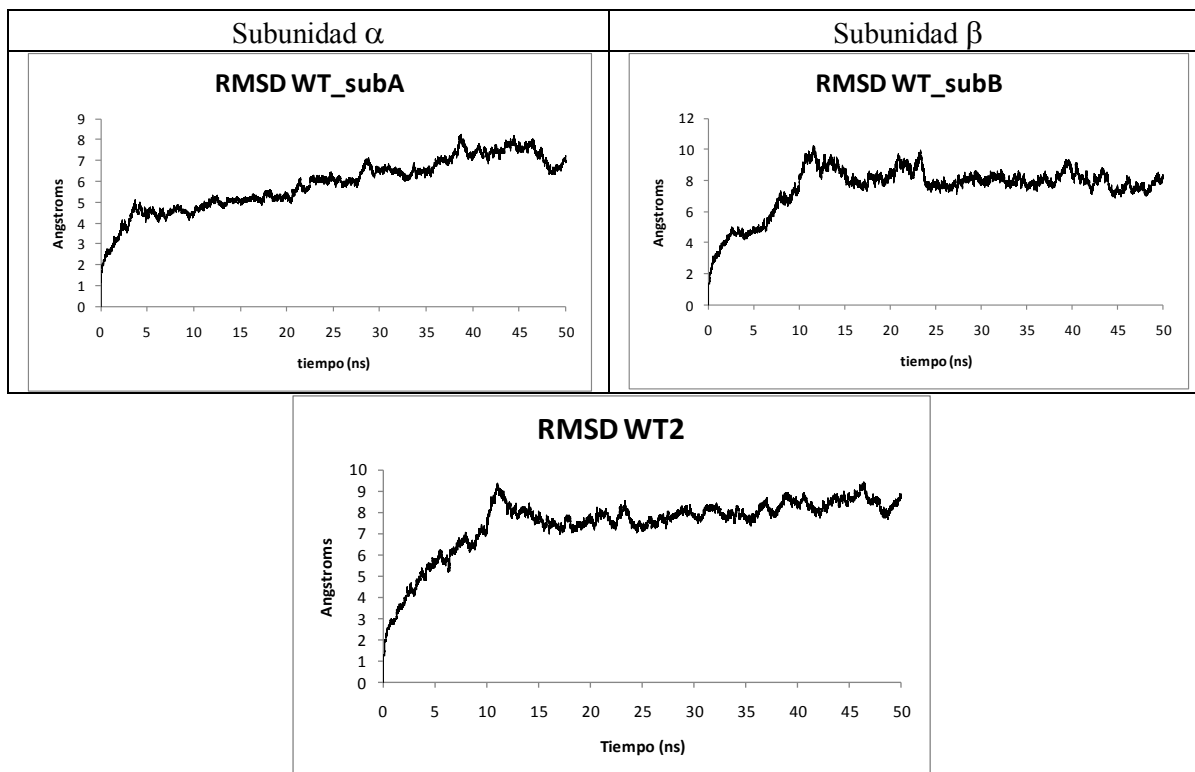


**Figura 22.** Modelo tridimensional del sistema silvestre de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana. Se omiten las moléculas de agua y los iones  $Cl^-$  y  $Na^+$ . a) Proteína aislada. b) Vista lateral de la proteína insertada en la membrana de fosfolípidos. c) Vista superior de la proteína insertada en la membrana de fosfolípidos.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  de la  $Na^+/K^+$  ATPasa de cerdo con la secuencia de aminoácidos de la subunidad respectiva de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica de humano, dio como resultado una matriz de porcentaje de identidad de 63.73%, mientras que para la subunidad  $\beta$  fue de 27.27%.

A partir de la simulación de 50 ns del sistema silvestre se realizó un análisis de trayectorias calculando el root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF) y radio de giro (Rg) del esqueleto de la proteína, para estudiar los movimientos estructurales del modelo proteico y su grado de expansión, obteniéndose lo siguiente:

En la **figura 23** se presentan los resultados del análisis de RMSD de las trayectorias de las dinámicas moleculares del sistema silvestre, considerando el backbone de la proteína. Como se puede observar, en la gráfica de RMSD para la subunidad  $\alpha$ , a partir de 20 ns comienza un incremento en los valores de RMSD, que termina alrededor de los 40 ns, cuando alcanza una tendencia de equilibrio con valores de  $\sim 8$  Å. Por otra parte, la subunidad  $\beta$  llega a un estado de equilibrio a partir de los 25 ns y hasta concluir los 50 ns de simulación, con valores de RMSD de  $\sim 8$  Å. Al analizar el RMSD de las dos subunidades en conjunto, es posible notar que a partir de los 20 ns se observa un ligero incremento en los valores de RMSD. Los últimos 6.9 ns corresponden al intervalo de tiempo en el que el sistema está en equilibrio.



**Figura 23.** Gráficas de RMSD del sistema silvestre por subunidades (parte superior izquierda para  $\alpha$  y derecha para  $\beta$ ) y considerando ambas subunidades (parte inferior).

En base a la suma de valores de RMSD de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , se hizo una partición de los 50 ns de simulación de la siguiente manera, con el fin de estudiar cuatro estructuras representativas de toda la dinámica molecular del sistema silvestre y establecer los cambios que presentó la proteína en cada lapso de tiempo. Esto se verá más a detalle en el capítulo 7.4 (Estudio de los sitios reactivos del timoprazol en los sistemas 815 y 824).

Primer intervalo: RMSD =  $7.7 \pm 1.0$  Å. Intervalo de tiempo de 12 ns a 24.0 ns.

Segundo intervalo: RMSD =  $7.7 \pm 1.0$  Å. Intervalo de tiempo de 24.1 ns a 36.2 ns.

Tercer intervalo: RMSD =  $8.25 \pm 0.75$  Å. Intervalo de tiempo de 36.3 ns a 43 ns.

Cuarto intervalo: RMSD =  $8.5 \pm 1.0$  Å. Intervalo de tiempo de 43.1 ns a 50 ns.

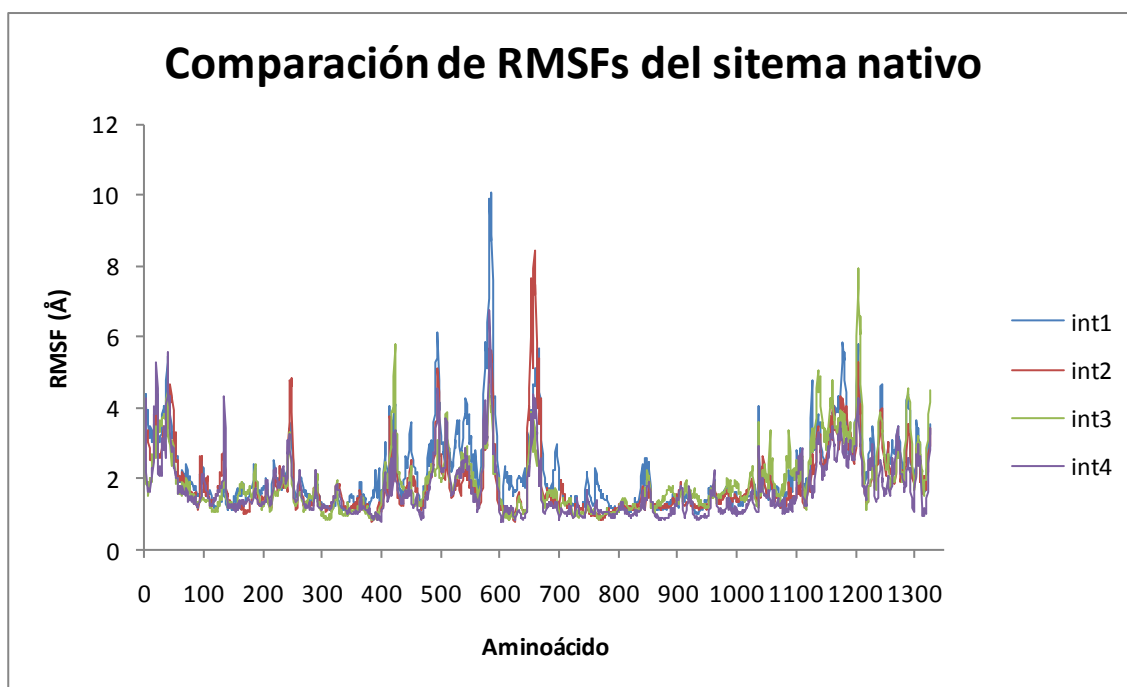
Se seleccionaron los 6.9 ns del cuarto intervalo, como el lapso de tiempo en el cual el sistema silvestre está en equilibrio conformacional.

El RMSF del backbone del sistema silvestre nos permite identificar los residuos que más se movieron durante determinados intervalos de tiempo. A partir de las 4 particiones de la dinámica del sistema silvestre, se estudiaron los RMSFs correspondientes a cada intervalo que se muestran en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Intervalos de tiempo de la simulación del sistema silvestre con los datos principales de RMSF.

# de intervalo	Residuos con RMFS > 6 Å	Intervalo de valores de RMSF (Å)
1	~(580 – 588)	6.0 – 10.06
2	~(651 – 660)	6.0 – 8.41
3	~(1203 – 1209)	6.0 – 7.91
4	582 – 583	6.0 – 6.73

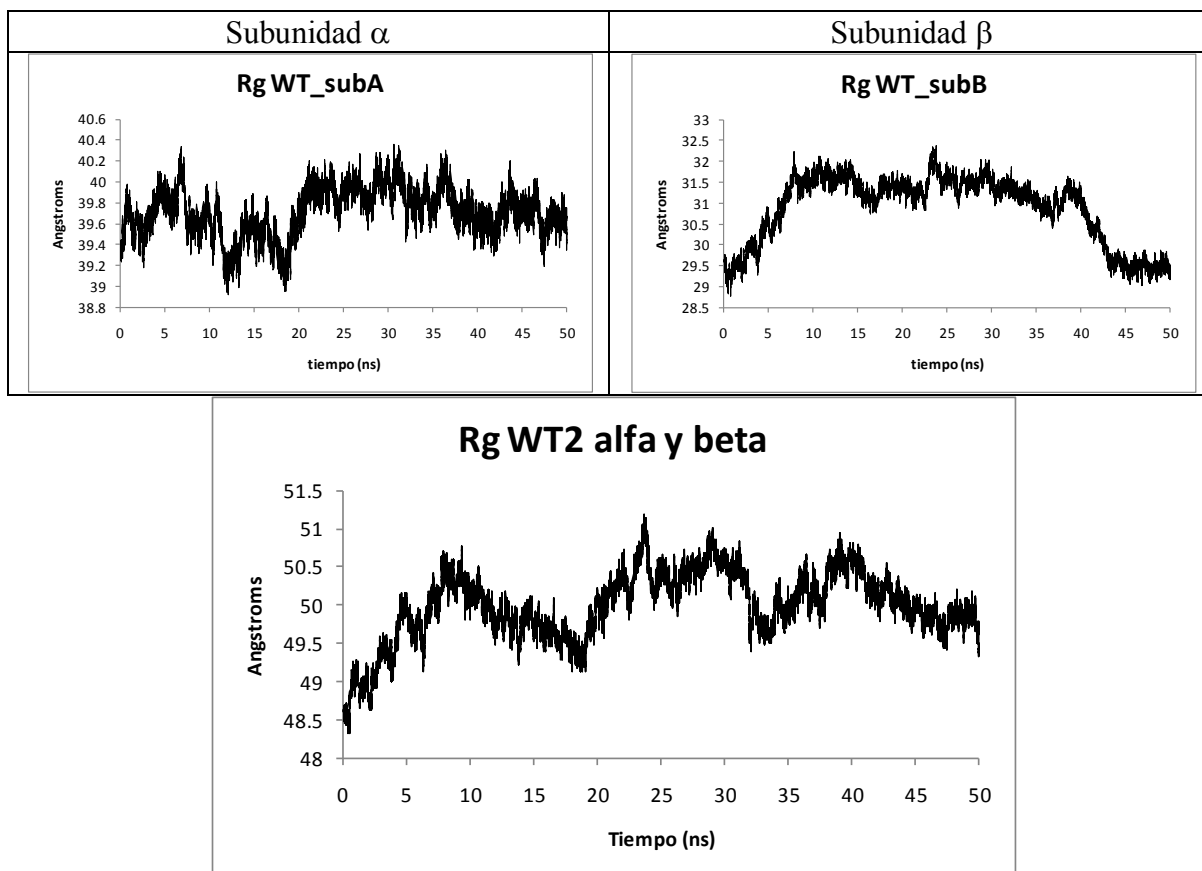
A partir de los resultados anteriores se puede afirmar que, durante la dinámica molecular del sistema silvestre, existen regiones de residuos muy flexibles, con fluctuaciones mayores a 6.0 Å. Conforme avanza la dinámica, cambia la flexibilidad de la proteína. En el primer intervalo de la dinámica, los residuos 580 - 588 presentan fluctuaciones de hasta 10.06 Å y, a medida que transcurre la simulación, los valores de movimiento máximos disminuyen, como en el caso del intervalo 4, donde la máxima fluctuación es de 6.73 Å. Esto se puede observar en la **figura 24**:



**Figura 24.** Gráfica de RMSF del sistema silvestre, para cada intervalo de tiempo, considerando todos los residuos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína.

Como se puede observar en la **figura 24**, el sistema silvestre presenta cuatro regiones de residuos con fluctuaciones considerables: la primera abarca los residuos 20 - 50, la segunda de 410 - 600, la siguiente ~ 660 y finalmente de 1150 - 1300.

El radio de giro del sistema silvestre se observa en la **figura 25**. En el intervalo de equilibrio la subunidad  $\alpha$  presenta valores de radio de giro, que van de  $\sim 39.2 \text{ \AA}$  a  $\sim 40.2 \text{ \AA}$ . Por su parte, la subunidad  $\beta$ , presenta valores de alrededor de  $29 \text{ \AA}$  en el mismo intervalo.



**Figura 25.** Gráficas de radio de giro del sistema silvestre por subunidades (parte superior izquierda para  $\alpha$  y derecha para  $\beta$ ) y considerando ambas subunidades (parte inferior).

El radio de giro que presenta la proteína completa en el intervalo de equilibrio corresponde a una ligera contracción de entre  $50.5 \text{ \AA}$  a  $49.7 \text{ \AA}$ . La variación en la expansión de la proteína a lo largo de los 50 ns de simulación no va más allá de  $3 \text{ \AA}$ , lo que indica que el volumen de la proteína no varía en gran medida durante toda la dinámica molecular.

Con el fin de analizar el cambio en la estructura global de la proteína, se determinó la proporción de estructuras secundarias al inicio de la dinámica molecular, en la estructura representativa de su intervalo de equilibrio y en la estructura representativa de su intervalo de equilibrio minimizada. Ver **tablas 6 y 7**

**Tabla 6.** Porcentaje de estructuras secundarias de la subunidad  $\alpha$  del sistema silvestre inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

<b>Estructura secundaria</b>	<b>Confórmero Inicial</b>	<b>Confórmero en el equilibrio</b>	<b>Confórmero minimizado</b>
% Asas	31.2	34.1	33.2
% Láminas	12.3	12.6	12.9
% Giros	8.9	8.4	8.3
% Hélices	47.6	44.9	45.5

Como se puede observar en la **tabla 6**, la estructura secundaria de la subunidad  $\alpha$  del sistema silvestre sólo cambió ligeramente en los confórmeros del equilibrio y minimizado, con respecto al estado inicial. La estructura secundaria que más se vio afectada por la dinámica molecular fue la de tipo hélice.

**Tabla 7.** Porcentaje de estructuras secundarias de la subunidad  $\beta$  del sistema silvestre inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

<b>Estructura secundaria</b>	<b>Confórmero Inicial</b>	<b>Confórmero en el equilibrio</b>	<b>Confórmero minimizado</b>
% Asas	64.6	62.5	62.9
% Láminas	6.2	15.1	14.8
% Giros	10.7	6.9	5.8
% Hélices	18.6	15.5	16.5

Por otra parte, como se puede apreciar en la **tabla 7**, la estructura secundaria de la subunidad  $\beta$  del sistema silvestre tuvo cambios más notables a comparación de los obtenidos en la subunidad  $\alpha$ , pues se alcanzaron cambios de  $\sim 9$  unidades, como en el caso de las láminas. Las asas, por su parte no tuvieron cambios considerables y las hélices disminuyeron menos de dos unidades en los confórmeros en el equilibrio y minimizado.

Adicionalmente se evaluaron las estructuras proteicas del sistema silvestre con las herramientas QMEAN, ANOLEA, D-fire y ProCheck obteniéndose los resultados contenidos en las **tablas 8 y 9**.

Según los valores de QMEAN6, presentados en la **tabla 8**, la estructura global de la proteína en el sistema silvestre se vio afectada desfavorablemente en el confórmero representativo del intervalo de equilibrio y en el confórmero minimizado, con respecto a la estructura inicial de las dinámicas. Esto debido a que el valor absoluto de los valores Z se incrementó ligeramente. El descriptor de QMEAN que más contribuyó para que se obtuvieran valores de QMEAN altos fue la energía de solvatación, que dice que tan expuestos están los residuos. Sin embargo la magnitud de estos valores están por debajo de

los que se obtienen para estructuras de proteínas transmembranales, resueltas por difracción de rayos X, que presentan valores de  $\sim 5$ .<sup>94</sup>

**Tabla 8.** Evaluación estructural de la proteína del sistema silvestre inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

<b>Término de la función de evaluación</b>	<b>Valor crudo<sub>0</sub></b>	<b>Valor Z<sub>0</sub></b>	<b>Valor crudo<sub>eq</sub></b>	<b>Valor Z<sub>eq</sub></b>	<b>Valor crudo<sub>min</sub></b>	<b>Valor Z<sub>min</sub></b>
Energía de interacción C- $\beta$	-133.94	-0.90	-152.45	-0.73	-174.06	-0.64
Energía de todos los átomos por parejas	-10624.12	-1.90	-13130.52	-1.47	-14086.77	-1.38
Energía de solvatación	-5.46	-2.96	-0.49	-3.09	0.44	-3.11
Energía de ángulo de torsión	-122.07	-2.31	-92.00	-2.85	-101.77	-2.68
Concordancia de Estructura secundaria	65.7%	-2.96	65.1%	-3.06	65.0%	-3.07
Concordancia de accesibilidad del disolvente	70.2%	-1.81	70.1%	-1.82	69.8%	-1.86
<b>QMEAN6 score</b>	0.487	-2.93	0.474	-3.06	0.476	-3.04
<b>Energía D-fire:</b>	-1771.91		-1801.36		-1878.21	

\* valores de energía (Kcal/mol).

**Tabla 9.** Resumen de los gráficos de Ramachandran del los confórmeros inicial y en el equilibrio de la dinámica molecular del sistema silvestre.

<b>Estado</b>	<b>Región favorable</b>	<b>Región permitida</b>	<b>Región atípica</b>	<b>Región no permitida</b>
Inicial	87.4%	10.7%	1.5%	0.3%
Equilibrio	81.4%	17.5%	0.8%	0.3%

El valor absoluto de D-fire se incrementa en los confórmeros de equilibrio y minimizado, indicando que la geometría de la proteína se favorece energéticamente. Esto indica que se está alcanzando una conformación más estable que la inicial, tanto en el confórmero representativo del intervalo de equilibrio como en el minimizado.

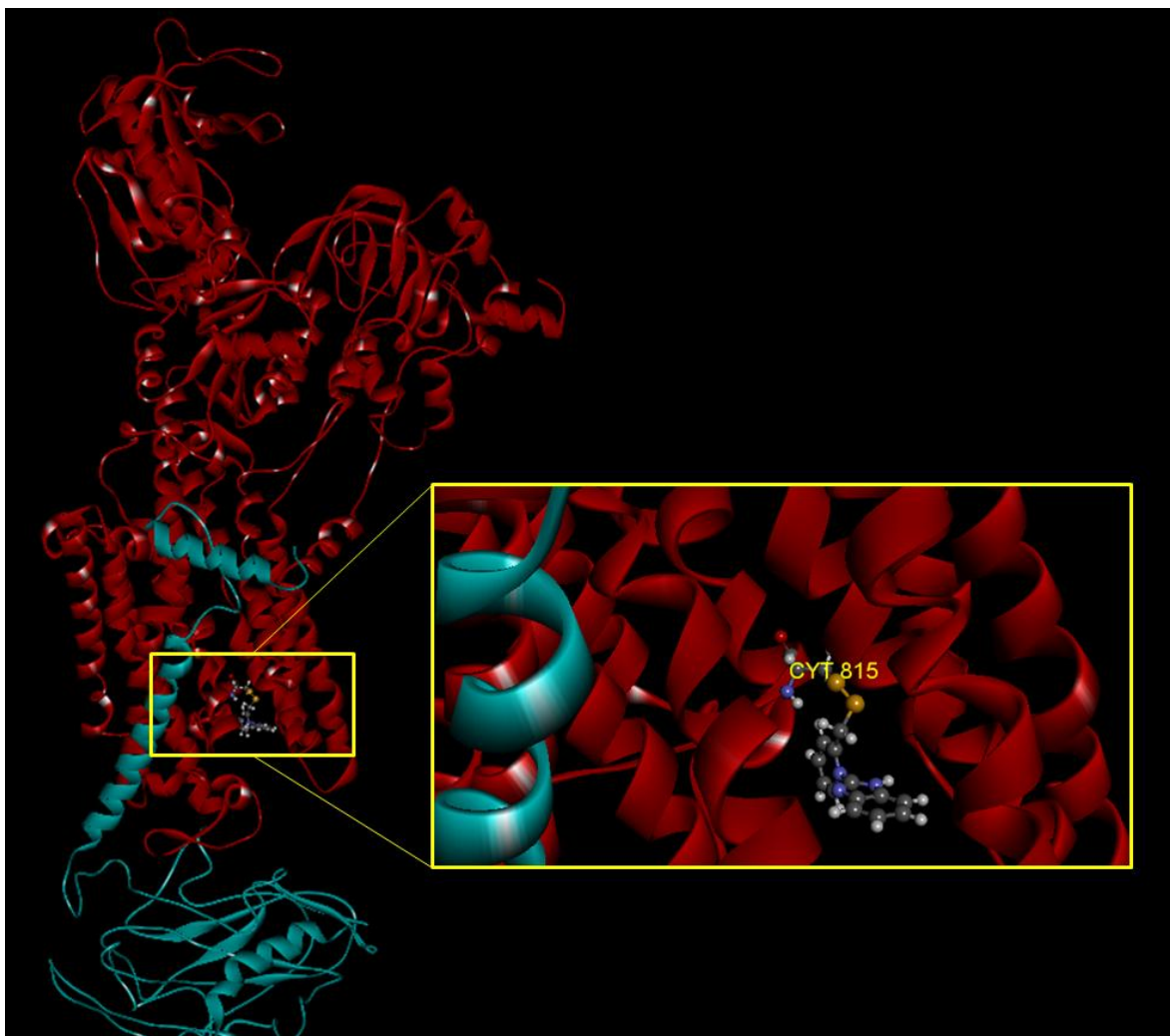
Por otra parte también se obtuvieron las gráficas de los valores de ANOLEA, correspondientes a los confórmeros inicial, representativo del intervalo de equilibrio y minimizado de la proteína del sistema silvestre, que se encuentran en el **anexo 4**. En las **figuras 39, 40\_1 a 40\_3, 41, 42\_1 a 42\_3, 43, 44\_1 y 44\_2** es posible observar el efecto que tuvo la dinámica molecular sobre el plegamiento de la proteína. La estructura inicial presentó bastantes regiones desfavorables de residuos, sobre todo en los residuos 830 y posteriores, que están caracterizados por valores mayores a cero, representados en barras color rojo. Sin embargo en los confórmeros representativos del equilibrio y minimizado, la mayoría de los residuos presentó valores negativos, indicando que las regiones de residuos se favorecieron, representadas en barras de color verde.



### 7.3.2. Modelado y dinámica molecular del sistema 815.

El sistema 815 se obtuvo sustituyendo la cisteína 815 del sistema silvestre por el residuo CYT, que está formado por el enlace covalente del producto de la transposición de Smiles del timoprazol con la cisteína 815, descrito a detalle en la metodología.

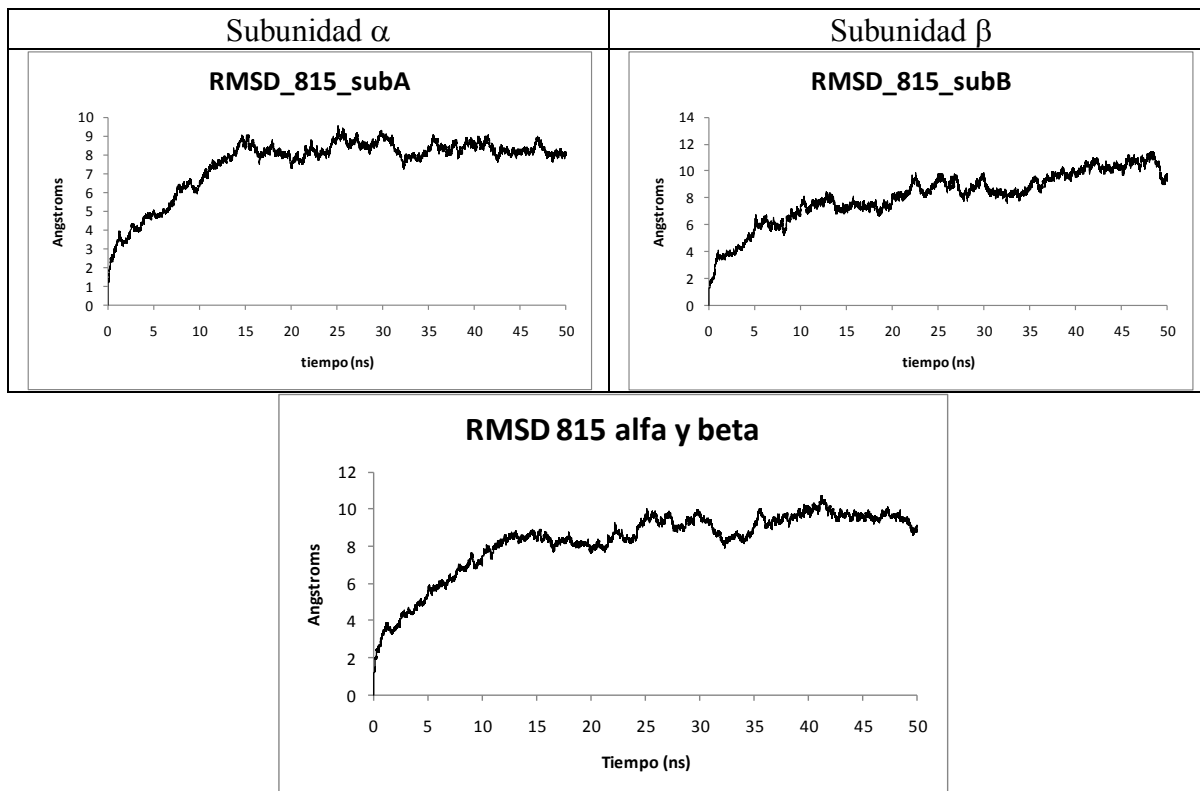
En la **figura 26** es posible notar que el residuo CYT 815 está rodeado por dominios transmembranales de la bomba de protones, por lo que se espera que los movimientos del residuo CYT 815 puedan afectar y verse afectados por los residuos que lo rodean.



**Figura 26.** Enlace disulfuro de la cisteína 815 del modelo de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana, considerado en este trabajo, con la forma activa del timoprazol, rodeado por residuos de la región transmembranal de la enzima del sistema 815.

Las gráficas de RMSD del sistema 815 se pueden observar en la **figura 27**. La subunidad  $\alpha$  presenta una tendencia horizontal a partir de 15 ns que se mantiene hasta el final de la simulación, con un valor de  $\sim 8.5$  Å, indicando que dicha subunidad está en equilibrio. La

subunidad  $\beta$  presenta una tendencia positiva durante toda la simulación, evidenciando que esa parte de la proteína no ha alcanzado el equilibrio tras finalizar la dinámica molecular. Al analizar ambas subunidades juntas, es posible observar una tendencia horizontal en los datos de RMSD, a partir de 40 ns y hasta finalizar la simulación, con valores de  $\sim 9.0$  Å, respecto a la conformación de partida, por lo que, la proteína completa alcanza un estado de equilibrio en los últimos 8 ns.



**Figura 27.** Gráficas de RMSD del sistema 815 por subunidades (parte superior izquierda para  $\alpha$  y derecha para  $\beta$ ) y considerando la proteína en su totalidad (parte inferior).

En base a los valores de RMSD que se obtuvieron para la proteína completa, se realizó una partición de los 50 ns de simulación de la siguiente forma:

Primer intervalo:  $\text{RMSD} = 8.5 \pm 1.0$  Å. Intervalo de tiempo de 12 ns a 18.0 ns.

Segundo intervalo:  $\text{RMSD} = 9.25 \pm 0.75$  Å. Intervalo de tiempo de 18.1 ns a 24.3 ns.

Tercer intervalo:  $\text{RMSD} = 8.5 \pm 0.75$  Å. Intervalo de tiempo de 24.4 ns a 31.4 ns.

Cuarto intervalo:  $\text{RMSD} = 10.0 \pm 1.5$  Å. Intervalo de tiempo de 31.5 ns a 35 ns.

Quinto intervalo:  $\text{RMSD} = 9.5 \pm 1.0$  Å. Intervalo de tiempo de 35.1 ns a 41.8 ns.

Sexto intervalo:  $\text{RMSD} = 9.5 \pm 1.0$  Å. Intervalo de tiempo de 42 ns a 50 ns.

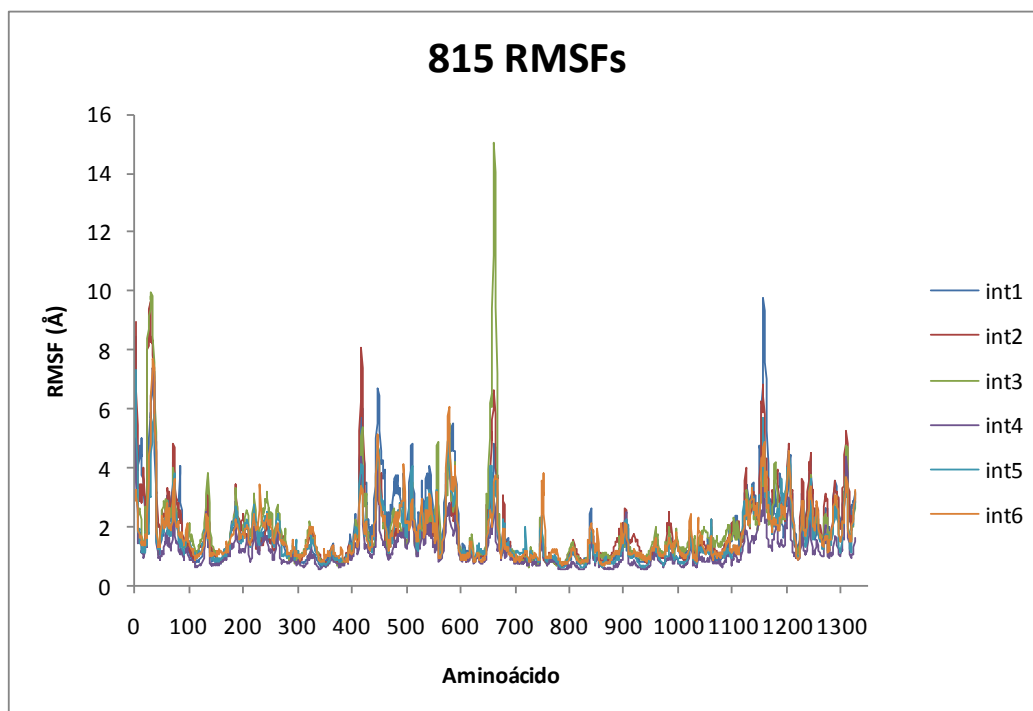
Se seleccionaron los 8 ns del sexto intervalo, como el lapso de tiempo en el cual el sistema 815 está en equilibrio conformacional.

Se obtuvieron seis estructuras representativas de toda la dinámica del sistema 815 que se revisarán más a detalle en el **capítulo 7.4**. A partir de las 6 particiones de la dinámica del sistema 815, y los valores de RMSF mayores a 6.0 Å, se realizó la **tabla 10**.

**Tabla 10.** Intervalos de tiempo de la simulación del sistema silvestre con valores mayores a 6 Å de RMSF.

# de intervalo	Residuos con RMFS > 6 Å	Intervalo de valores de RMSF (Å)
1	(1-36), (418-419), (447-450) y (1150 – 1162)	6.0 – 9.75
2	(1-36), (417-419), 660 y (1154 – 1158)	6.0 – 9.67
3	(1-37), (660-664)	6.0 – 15.05
4	(1-36)	6.0 – 7.36
5	1	7.33
6	(1-36)	6 – 7.69

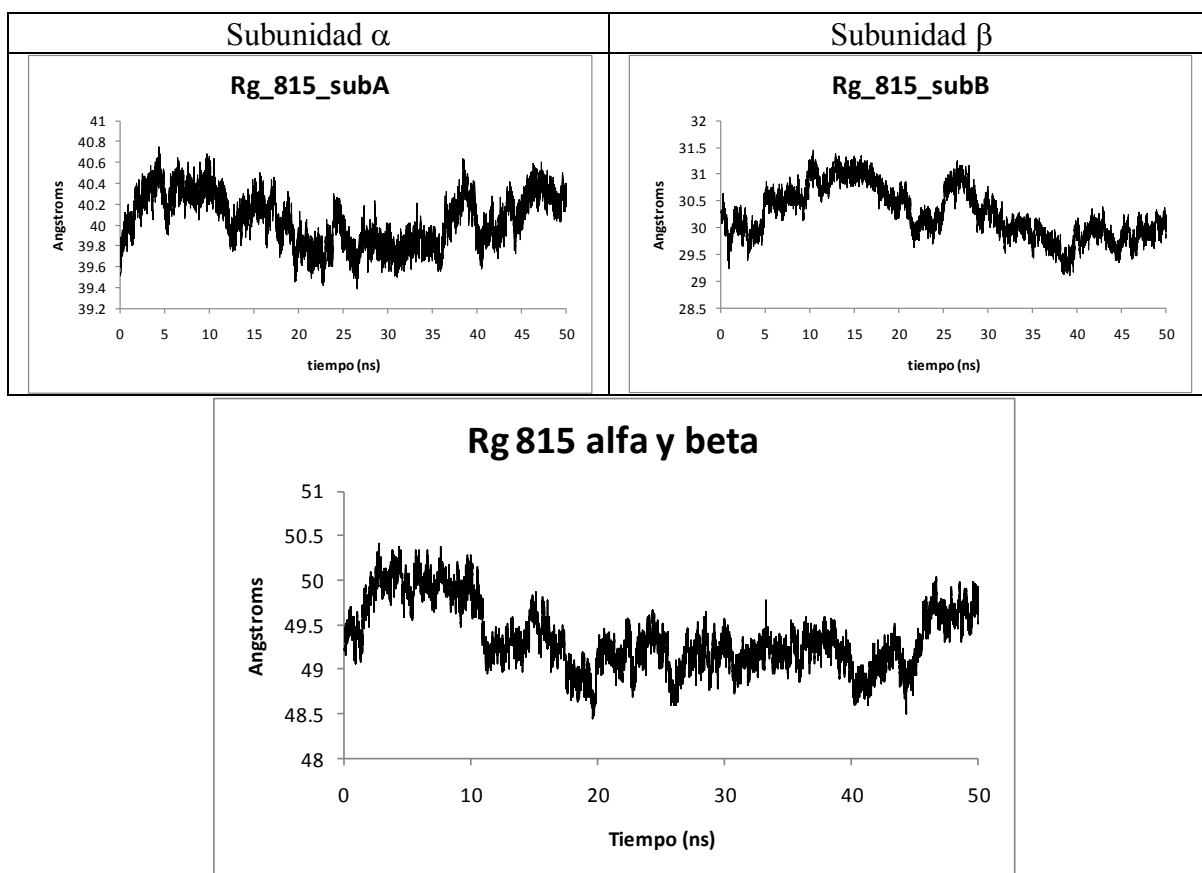
A partir de los resultados anteriores, se puede notar que en el sistema 815 existen regiones de residuos bastante flexibles, por ejemplo del intervalo 1, (la región de 1-36) y del intervalo 3, (región de 660 a 664), los residuos mostraron hasta 15.05 Å de fluctuaciones. Sin embargo, al término de la simulación, en el intervalo 6, ya no se presentan tantos movimientos, excepto en la región de 1 a 36, que llegan alcanzar fluctuaciones de hasta 7.69 Å. Esto se puede observar de manera cualitativa en la **figura 28**.



**Figura 28.** Gráfica de RMSF del sistema 815, para cada intervalo de tiempo, considerando todos los residuos de las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína.

Como se puede observar en la **figura 28** el sistema 815 presenta cuatro regiones de residuos con fluctuaciones considerables: la primera de 1 - 40, la segunda de 410 - 600, la siguiente ~660 y última ~1150.

En cuanto al radio de giro en el intervalo de equilibrio del sistema 815 (**figura 29**), la subunidad  $\alpha$  presenta una tendencia constante de  $\sim 40.3$  Å. Por su parte, la subunidad  $\beta$  tiene una ligera expansión, finalizando con un valor de  $\sim 30.4$  Å.



**Figura 29.** Gráficas de radio de giro del sistema silvestre por subunidades (parte superior izquierda para  $\alpha$  y derecha para  $\beta$ ) y considerando ambas subunidades (parte inferior).

El radio de giro de ambas subunidades presenta una tendencia de expansión en los últimos 8 ns, alcanzando un valor máximo de 50 Å. En general la expansión de este sistema no varía más allá de 2 Å.

Con el fin de analizar el cambio en la estructura global de la proteína del sistema 815, se determinó la distribución de estructuras secundarias en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del sistema

815, al inicio de la dinámica molecular, en la estructura representativa de su intervalo de equilibrio y, finalmente, en la estructura minimizada (**tablas 11 y 12**).

**Tabla 11.** Porcentaje de estructuras secundarias de la subunidad  $\alpha$  del sistema 815 inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

Estructura secundaria	Confórmero Inicial	Confórmero en el equilibrio	Confórmero minimizado
% Asas	31.2	48.7	49.3
% Láminas	12.3	11.8	11.9
% Giros	8.9	9.3	8.5
% Hélices	47.6	30.2	30.3

Como se puede observar en la **tabla 11**, las hélices de la subunidad  $\alpha$  fueron las estructuras secundarias que más se vieron afectadas durante la dinámica molecular. Al inicio, la proteína tenía un 47.6% de hélices, mientras que en el confórmero del equilibrio disminuyó el porcentaje a 30.2% y en el minimizado a 30.3%. Por otra parte, el porcentaje de asas aumento considerablemente, de 31.2% a 48.7% y 49.3% en las estructuras en el equilibrio y minimizada respectivamente, indicando que la estructura global de la subunidad  $\alpha$  se adquirió una conformación irregular con respecto a su estructura inicial.

**Tabla 12.** Porcentaje de estructuras secundarias de la subunidad  $\beta$  del sistema 815 inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

Estructura secundaria	Confórmero Inicial	Confórmero en el equilibrio	Confórmero minimizado
% Asas	64.6	70.4	69.1
% Láminas	6.2	16.5	17.9
% Giros	10.7	2.4	2.4
% Hélices	18.6	10.7	10.7

En la **tabla 12** se presentan los resultados de estructuras secundarias obtenidos para la subunidad  $\beta$  del sistema 815. En este caso se puede observar que el porcentaje de asas incrementó de 64.6% a 70.4% y 69.1%, en los confórmeros en el equilibrio y minimizado. También, se puede notar que el porcentaje de láminas se incrementó de 6.2 % a 16.5% y 17.9% en los confórmeros en el equilibrio y minimizado, respectivamente. El porcentaje de hélices disminuyó casi 8 unidades.

Adicionalmente se evaluaron las estructuras proteicas con las herramientas QMEAN, ANOLEA, D-fire y y ProCheck obteniéndose los resultados contenidos en las **tablas 13 y 14**.

**Tabla 13.** Evaluación estructural de la proteína del sistema 815 inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

<b>Término de la función de evaluación</b>	<b>Valor crudo<sub>0</sub></b>	<b>Valor Z<sub>0</sub></b>	<b>Valor crudo<sub>eq</sub></b>	<b>Valor Z<sub>eq</sub></b>	<b>Valor crudo<sub>min</sub></b>	<b>Valor Z<sub>min</sub></b>
Energía de interacción C-β	-135.38	-0.90	-94.22	-1.04	-116.46	-0.94
Energía de todos los átomos por parejas	-10703.36	-1.89	-8114.10	-2.07	-8658.73	-2.02
Energía de solvatación	-5.77	-2.95	41.22	-4.15	37.79	-4.06
Energía de ángulo de torsión	-122.14	-2.30	-12.16	-4.26	-9.85	-4.30
Concordancia de Estructura secundaria	65.5%	-2.95	60.1%	-3.94	59.9%	-3.97
Concordancia de accesibilidad del disolvente	70.0%	-1.82	67.6%	-2.25	68.0%	-2.18
<b>QMEAN6 score</b>	0.485	-2.93	0.384	-4.00	0.388	-3.96
<b>*Energía D-fire:</b>	-1767.04		-1704.27		-1758.38	

\* Valores de energía (Kcal/mol).

**Tabla 14.** Resumen de los gráficos de Ramachandran del los conformeros inicial y en el equilibrio de la dinámica molecular del sistema 815.

<b>Estado</b>	<b>Región favorable</b>	<b>Región permitida</b>	<b>Región atípica</b>	<b>Región no permitida</b>
Inicial	87.4%	10.7%	1.5%	0.3%
Equilibrio	71.9%	25.8%	2.2%	0.1%

Según los valores de QMEAN6, presentados en la **tabla 13**, la estructura global de la proteína, en el sistema 815, se vio afectada desfavorablemente en el estado de equilibrio y en la estructura minimizada correspondiente, esto con respecto a la estructura inicial de las dinámicas. La contribución que más afectó para que se obtuvieran valores de QMEAN altos fue la energía de ángulo de torsión, que dice cómo se encuentra la geometría local del esqueleto de la proteína. Por otra parte, el valor absoluto de D-fire disminuye en los conformeros de equilibrio y minimizado, indicando que la geometría de la proteína se está desestabilizando.

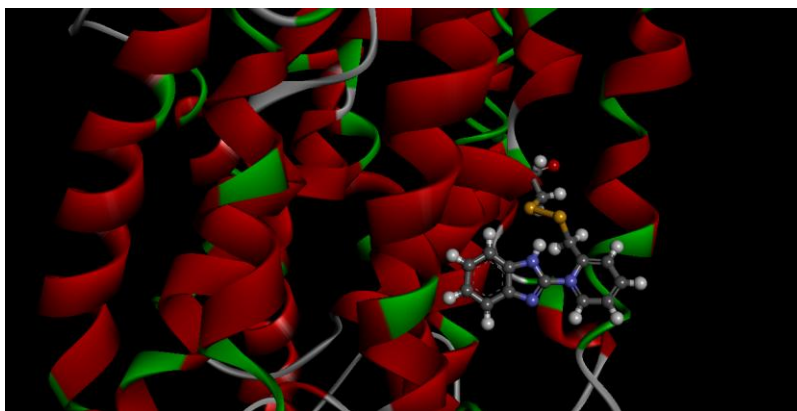
La presencia del residuo CYT en la posición 815 provoca que no se alcance la estabilidad energética medida con D-fire, que si se alcanzó en el sistema silvestre, lo que sugiere que esta modificación de la cisteína 815 por el residuo CYT afecte la transición de la proteína a su conformación más estable.

Por otra parte también se obtuvieron las gráficas de valores de ANOLEA, correspondiente a los conformeros inicial, en el equilibrio y minimizado, de la proteína del sistema 815, que se encuentran en el **anexo 4**. En las **figuras 45, 46\_1 a 46\_3, 47, 48\_1 a 48\_3, 49, 50\_1 y 50\_2** es posible observar el efecto que tuvo la dinámica molecular sobre el plegamiento de la proteína. La estructura inicial presentó bastantes regiones

desfavorables de aminoácidos, sobre todo en los residuos 830 y en adelante, caracterizados por valores mayores a cero, representados en barras color rojo. Sin embargo en los estados en el equilibrio y en el equilibrio minimizado, la mayoría de los residuos presentó valores negativos, indicando que las regiones de residuos se favorecieron y presentaron energías menores a cero.

### 7.3.3. Modelado y dinámica molecular del sistema 824.

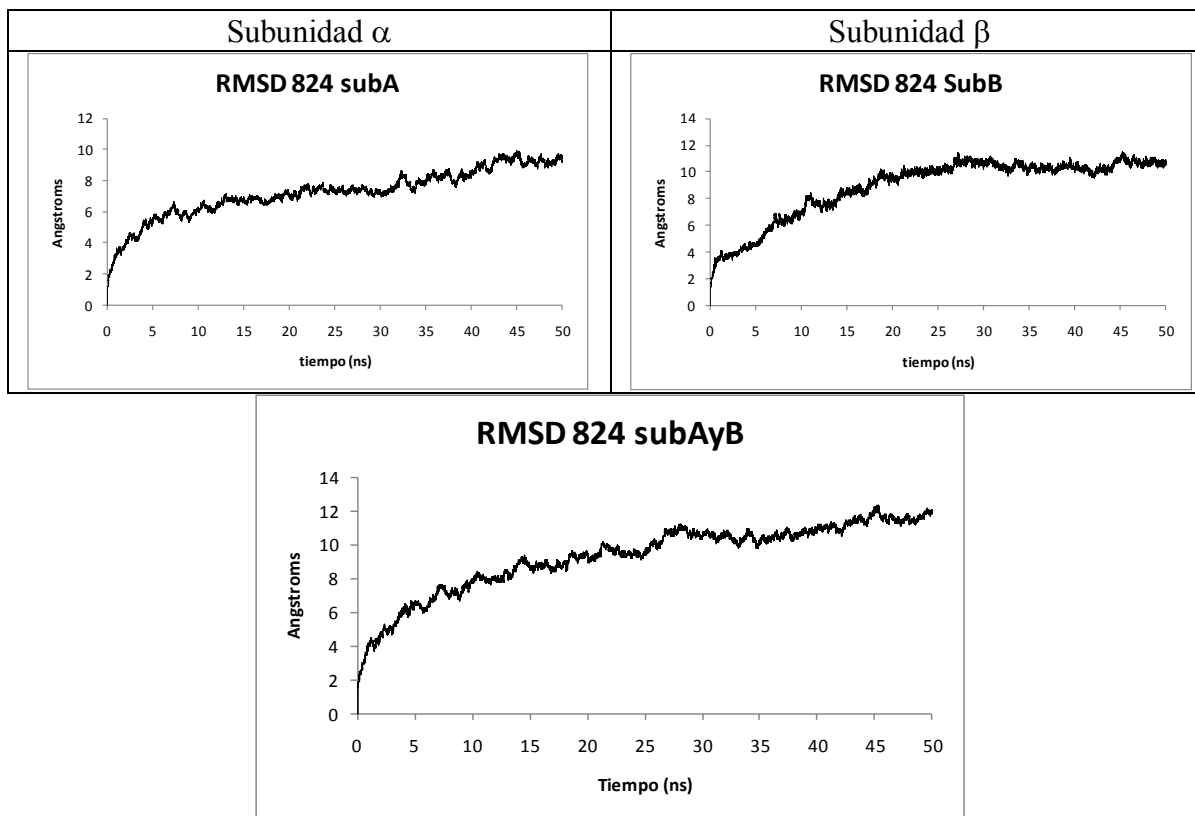
El sistema 824 se obtuvo sustituyendo la cisteína 824 del sistema silvestre por el residuo CYT. En la **figura 30** se muestra el residuo CYT 824, que se encuentra localizado en un extremo de los dominios transmembranales de la bomba de protones, lo que le aporta menos interacciones con residuos cercanos, a comparación del residuo CYT 815.



**Figura 30.** Enlace disulfuro de la cisteína 824 de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana con el timoprazol, rodeado por residuos de la región transmembranal de la enzima del sistema 824.

El RMSD de la subunidad  $\alpha$  del sistema 824 se presenta en la primera gráfica de la **figura 31**. En esta gráfica es posible observar que en los últimos 7 ns de simulación, la subunidad  $\alpha$  alcanzó un estado de equilibrio debido a la tendencia horizontal de valores de RMSD de  $\sim 9 \text{ \AA}$ . La subunidad  $\beta$ , presenta una tendencia de equilibrio a partir de 27 ns, hasta finalizar los 50 ns, con valores cercanos a  $11 \text{ \AA}$

El RMSD de ambas subunidades describe una tendencia de equilibrio los últimos 7ns de la dinámica molecular, con una tendencia horizontal con un valor de  $\sim 12 \text{ \AA}$ .



**Figura 31.** Gráficas de RMSD del sistema 824 por subunidades (parte superior izquierda para  $\alpha$  y derecha para  $\beta$ ) y considerando ambas subunidades (parte inferior).

En base a los valores de RMSD que se obtuvieron para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  juntas, se determinó hacer una partición de los 50 ns de simulación de la siguiente forma:

Primer intervalo:  $\text{RMSD} = 8.75 \pm 0.75 \text{ \AA}$ . Intervalo de tiempo de 14 ns a 18.4 ns.

Segundo intervalo:  $\text{RMSD} = 9.25 \pm 0.75 \text{ \AA}$ . Intervalo de tiempo de 18.5 ns a 25.4 ns.

Tercer intervalo:  $\text{RMSD} = 10.5 \pm 1.0 \text{ \AA}$ . Intervalo de tiempo de 25.5 ns a 34 ns.

Cuarto intervalo:  $\text{RMSD} = 10.5 \pm 1.0 \text{ \AA}$ . Intervalo de tiempo de 34.1 ns a 42.4 ns.

Quinto intervalo:  $\text{RMSD} = 12 \pm 1.0 \text{ \AA}$ . Intervalo de tiempo de 42.5 ns a 50 ns.

Se seleccionaron los 7.5 ns del quinto intervalo, como el lapso de tiempo en el cual el sistema 824 está en equilibrio conformacional.

Posteriormente, se obtuvieron cinco estructuras representativas de toda la dinámica del sistema 824 que se revisarán más a detalle en el capítulo 7.4.

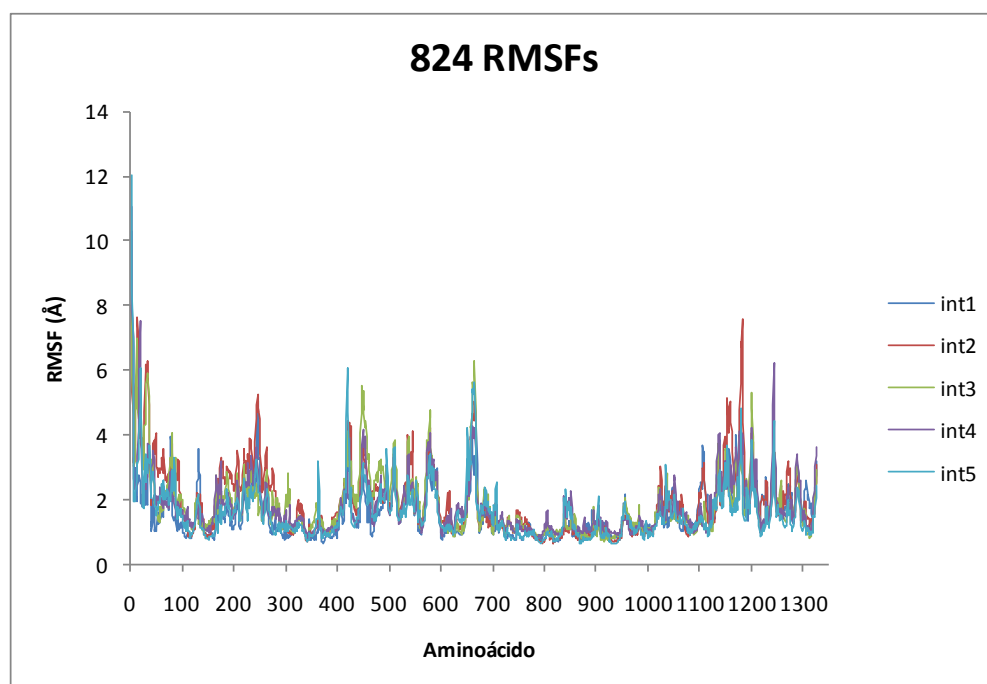
A partir de las 5 particiones de la dinámica del sistema 824, y los valores de RMSF mayores a  $6.0 \text{ \AA}$ , se realizó la **tabla 15**.



**Tabla 15.** Intervalos de tiempo de la simulación del sistema 824 con los datos más importantes de RMSF.

# de intervalo	Residuos con RMFS > 6 Å	Intervalo de valores de RMSF (Å)
1	(1 - 4)	6.0 – 10.32
2	(1 - 30) y (1180 – 1184)	6.0 – 7.99
3	(1 - 18), (664 - 665)	6.0 – 7.78
4	(1 - 19), 1243	6.0 – 11.06
5	(1 - 19), 420	6.0 – 12.01

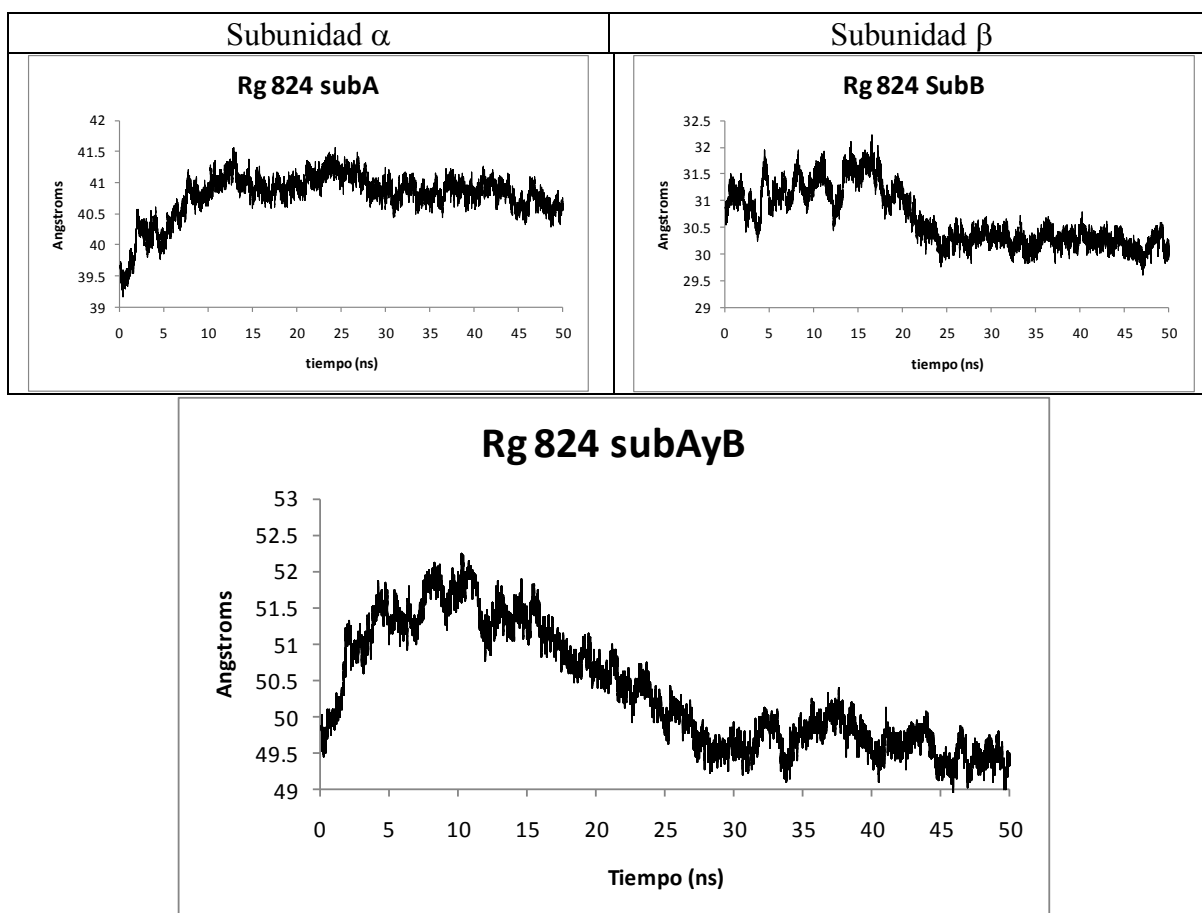
Como se puede observar en la **tabla 15**, en el sistema 824 se presenta una región con residuos muy móviles, correspondientes al intervalo 1 - 19, que en los últimos tres intervalos, llegan a presentar fluctuaciones de hasta 12.01 Å. Esto se puede observar en la **figura 32**. A medida que avanza el tiempo de la dinámica se presentan fluctuaciones más altas, contrario al comportamiento que se había observado en los sistemas silvestre y 815, donde al paso de la dinámica, la magnitud de las fluctuaciones se reducía. Otro aspecto importante a comparación de los dos sistemas anteriores es la reducción en la magnitud de la fluctuación en la región de los residuos de ~660, pues en este sistema se alcanza una fluctuación máxima de 7 Å, mientras que en el silvestre fue ~8.4 Å y ~15 Å para el sistema 815.



**Figura 32.** Gráfica de RMSF del sistema 824, para cada intervalo de tiempo, considerando todos los residuos de las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína.

Como se puede observar en la **figura 32**, el sistema 824 presenta cuatro regiones de residuos con fluctuaciones considerables: la primera de 1 - 40, la segunda de 180 - 280, la siguiente de 410 - 680 y finalmente, de 1150 - 1250.

Las gráficas de radio de giro del sistema 824 se presentan en la **figura 33**. La subunidad  $\alpha$ , durante el intervalo de equilibrio, presenta una tendencia horizontal con valores alrededor de 40.7 Å. Por su parte, la subunidad  $\beta$ , en el mismo lapso de tiempo, alcanza un valor de radio de giro de ~30.2 Å, que permanece constante hasta finalizar los 50 ns.



**Figura 33.** Gráficas de radio de giro del sistema 824 por subunidades (parte superior izquierda para  $\alpha$  y derecha para  $\beta$ ) y considerando ambas subunidades (parte inferior).

El radio de giro considerando ambas subunidades, en el lapso de equilibrio, presenta un comportamiento oscilatorio de 49 - 50 Å durante los 50 ns. A diferencia de los sistemas silvestre y 815, el sistema 824 presenta una contracción en su volumen a partir de ~ 10 ns y termina con variaciones menores a 1.5 Å.

Con el fin de analizar el cambio en la estructura global de la proteína del sistema 824, se determinó la distribución de las estructuras secundarias de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del sistema 824, al inicio de la dinámica molecular, en el conformero de equilibrio y en el conformero minimizado. Ver **tablas 16 y 17**.

**Tabla 16.** Porcentaje de estructuras secundarias de la subunidad  $\alpha$  del sistema 824 inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

Estructura secundaria	Conformero Inicial	Conformero en el equilibrio	Conformero minimizado
% Asas	31.2	44.8	44.3
% Láminas	12.3	13.1	12.9
% Giros	8.9	17.3	15.4
% Hélices	47.6	24.7	27.5

**Tabla 17.** Porcentaje de estructuras secundarias de la subunidad  $\alpha$  del sistema 824 inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

Estructura secundaria	Conformero Inicial	Conformero en el equilibrio	Conformero minimizado
% Asas	64.6	67.4	67.7
% Láminas	6.2	17.2	17.2
% Giros	10.7	7.9	7.6
% Hélices	18.6	7.6	7.6

Adicionalmente se evaluaron las estructuras proteicas con las herramientas QMEAN, ANOLEA, D-fire y Procheck obteniéndose los siguientes resultados, que se muestran en las **tablas 18 y 19**.

Según los valores de QMEAN6, presentados en la **tabla 18**, la estructura global de la proteína en el sistema 824 se vio afectada desfavorablemente en el conformero del equilibrio y en el minimizado correspondiente, con respecto a la estructura inicial de las dinámicas, ya que el valor absoluto de los valores Z se incremento. La contribución que más afectó para que se obtuvieran estos valores fue la concordancia de la estructura secundaria predicha y calculada. Por otra parte, el valor absoluto de D-fire disminuye en el conformero de equilibrio y aumenta en el conformero minimizado, indicando que la geometría de la proteína se desfavorece en el equilibrio pero se favorece en el conformero minimizado.

**Tabla 18.** Evaluación estructural de la proteína del sistema 824 inicial, en el equilibrio y en la estructura minimizada del equilibrio.

<b>Término de la función de evaluación</b>	<b>Valor crudo<sub>0</sub></b>	<b>Valor Z<sub>0</sub></b>	<b>Valor crudo<sub>eq</sub></b>	<b>Valor Z<sub>eq</sub></b>	<b>Valor crudo<sub>min</sub></b>	<b>Valor Z<sub>min</sub></b>
Energía de interacción C-β	-139.90	-0.88	-111.74	-0.96	-113.45	-0.96
Energía de todos los átomos por parejas	-10809.09	-1.88	-9180.57	-1.95	-9606.47	-1.92
Energía de solvatación	-6.48	-2.94	37.12	-4.04	43.13	-4.20
Energía de ángulo de torsión	-122.62	-2.29	-52.25	-3.54	-69.82	-3.23
Concordancia de estructura secundaria	65.3%	-3.00	56.1%	-4.64	56.5%	-4.58
Concordancia de accesibilidad del disolvente	70.0%	-1.84	68.4%	-2.11	68.3%	-2.12
<b>QMEAN6 score</b>	0.483	-2.96	0.401	-3.82	0.412	-3.71
<b>*Energía D-fire:</b>	-1767.88		-1714.45		-1779.33	

\* Valores de energía (Kcal/mol).

**Tabla 19.** Resumen de los gráficos de Ramachandran del los confórmeros inicial y en el equilibrio de la dinámica molecular del sistema 824.

<b>Estado</b>	<b>Región favorable</b>	<b>Región permitida</b>	<b>Región atípica</b>	<b>Región no permitida</b>
Inicial	87.4%	10.7%	1.5%	0.3%
Equilibrio	76.6%	21.7%	1.6%	0.1%

Por otra parte también se obtuvieron las gráficas de valores de ANOLEA, correspondiente a los estados inicial, en el equilibrio y en el equilibrio minimizado, de la proteína del sistema 815, que se encuentran en el **anexo 4**. En las **gráficas 51, 52\_1 a 52\_3, 53, 54\_1 a 54\_3, 55, 56\_1 y 56\_2** es posible observar el efecto que tuvo la dinámica molecular sobre el plegamiento de la proteína. La estructura inicial presentó bastantes regiones desfavorables de residuos, sobre todo en los residuos 830 en adelante, caracterizados por valores mayores a cero, representados en barras color rojo. Sin embargo en los estados en el equilibrio y en el equilibrio minimizado, la mayoría de los residuos presentó valores negativos, indicando que las regiones de residuos se favorecieron y presentaron energías menores a cero.

#### **7.4. Estudio de los sitios reactivos del timoprazol en los sistemas 815 y 824.**

A partir de las cuatro estructuras representativas optimizadas del sistema silvestre, se determinaron los residuos cercanos a las cisteínas 815 y 824 (ver **tabla 20**). Estos residuos se tomarán como referencia para compararlos cuando se sustituyan las cisteínas 815 y 824 por el enlace disulfuro del producto de la transposición de Smiles del timoprazol con la cisteína correspondiente.

**Tabla 20.** Residuos cercanos a las cisteína 815 y 824 en el sistema silvestre.

<b>Residuos cercanos a la cisteína 815</b>	<b>Residuos cercanos a la cisteína 824</b>
LEU143	PHE820
ALA337	GLU822
GLY814	LEU823
ILE816	THR825
THR817	ASP826
ILE818	PHE934
LEU819	GLN973

#### 7.4.1. Sitio reactivo del residuo CYT 815.

A partir de las estructuras representativas optimizadas de los seis intervalos del sistema 815, se obtuvieron los residuos que interaccionaron a lo largo de la dinámica con la parte del timoprazol del residuo CYT 815, son: leucina 811, valina 333, asparagina 140. Además de los residuos anteriores, el prazol del residuo CYT 815 siempre estuvo rodeado de al menos trece diferentes moléculas de agua, indicando que el carácter de esa región de interacciones es hidrofílico.

Posteriormente, se estudiaron por medio de la densidad electrónica, en los puntos críticos de enlace correspondientes, las interacciones intermoleculares del residuo CYT 815 con los residuos antes mencionados, en las estructuras representativas del primer intervalo y del equilibrio del sistema 815.

A partir de la estructura representativa del primer intervalo del sistema 815 se obtuvieron las interacciones contenidas en la **tabla 21**. Las interacciones más importantes que presentó la parte del timoprazol del residuo CYT 815 se presentan con la leucina 811, valina 333 y asparagina 140. El resto de interacciones se presentan en el **anexo 5**.

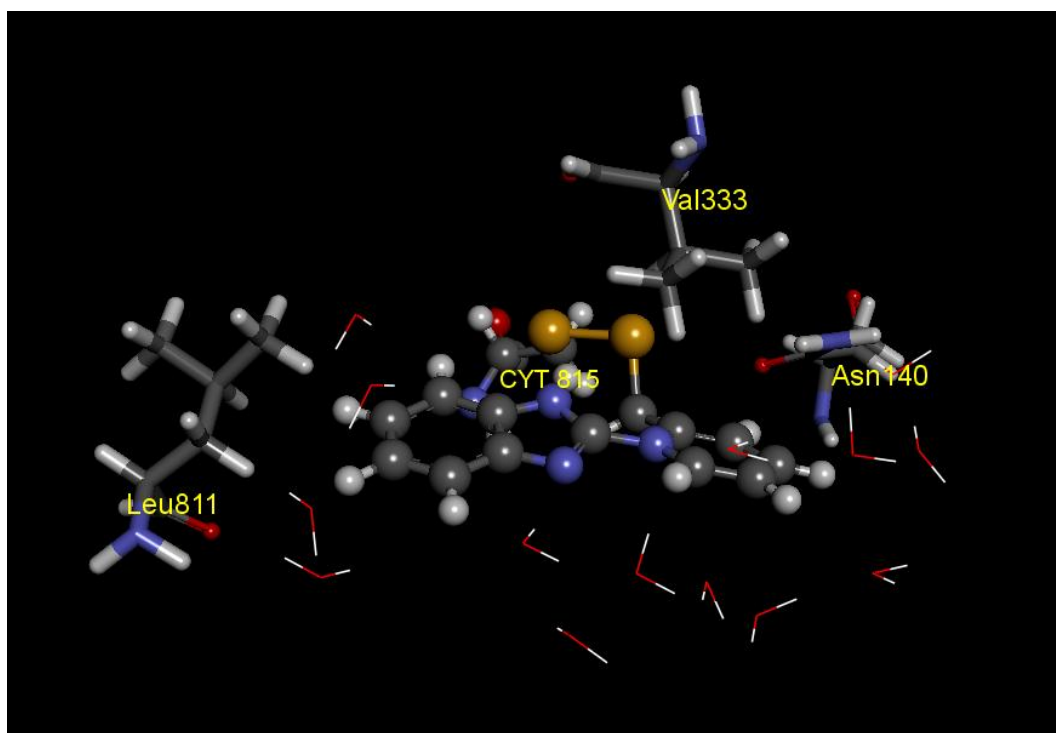
**Tabla 21.** Interacciones interatómicas del residuo CYT 815 con residuos cercanos en el intervalo 1

<b>Punto crítico</b>	<b>Átomo de residuo</b>	<b>Átomo de prazol</b>	<b>Rho (u.a.)</b>
20	O (Asn140)	H	0.006626
21	N (Asn140)	H	0.005561
11	H (Val333)	N	0.004427
12	H (Val333)	N	0.005316
14	H (Val333)	S	0.005317
8	H (Leu811)	C	0.003745

En la estructura representativa optimizada del intervalo de equilibrio del sistema 815, se obtuvieron las interacciones más importantes, que se presentan en la **tabla 22**. El resto de interacciones se encuentran en el **anexo 5**.

**Tabla 22.** Interacciones interatómicas del residuo CYT 815 con residuos cercanos en el intervalo de equilibrio

Punto crítico	Átomo de residuo	Átomo de prazol	Rho (u.a.)
16	O (Asn140)	S	0.004286
18	O (Asn140)	H	0.012454
19	H (Asn140)	C	0.00588
15	H (Val333)	S	0.00653
20	H (Val333)	C	0.002133
28	H (Val333)	C	0.002682
7	H (Leu811)	C	0.007534



**Figura 34.** Interacciones principales de la parte del timoprazol del residuo CYT 815 con residuos cercanos.

Al comparar las **tablas 21 y 22**, se puede notar que los residuos leucina 811, valina 333 y asparagina 140 no siempre interactúan con los mismos átomos con la parte del timoprazol, sin embargo mantienen interacciones mayores a 0.002 u.a. que los mantienen en contacto con esa fracción del residuo CYT 815, todo esto bajo condiciones hidrofílicas.

#### 7.4.2. Sitio reactivo del residuo CYT 824.

A partir de las estructuras representativas optimizadas del sistema 824, se obtuvieron los residuos más cercanos al residuo CYT 824, que adicionales a los residuos cercanos a la cisteína 824 en el sistema silvestre, se encontraron los siguientes: tirosina 142, alanina 146, isoleucina 816, fenilalanina 820, metionina 986 y fenilalanina 990.

Para establecer los cambios en el sitio reactivo de la cisteína 824, se estudiaron, por medio de la densidad electrónica en los puntos críticos de enlace correspondientes, las interacciones intermoleculares del residuo CYT 824 con sus residuos circundantes en la estructura representativa del primer intervalo del sistema 824 y en la estructura representativa del intervalo cinco, correspondiente al lapso de equilibrio del sistema 824.

En la estructura representativa optimizada del primer intervalo del sistema 824 se obtuvieron las interacciones importantes, contenidas en la **tabla 23**. El resto de interacciones se presentan en el **anexo 5**.

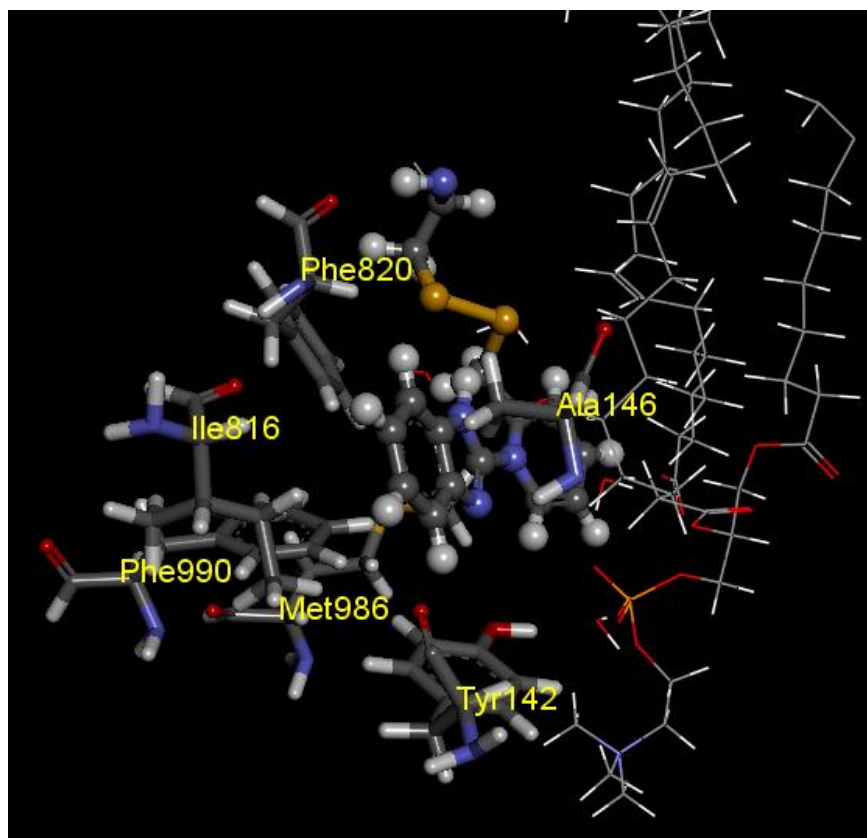
**Tabla 23.** Interacciones interatómicas del residuo CYT 824 con residuos cercanos en el intervalo 1

Punto crítico	Átomo de aminoácido	Átomo de prazol	Rho
2	O (tyr142)	H	0.007302
3	C (tyr142)	H	0.006499
4	O (tyr142)	H	0.007879
21	O (tyr142)	N	0.00286
5	O (ile816)	H	0.001791
6	H (phe820)	C	0.004675
8	C (phe820)	H	0.005736

En la estructura representativa optimizada del quinto intervalo de equilibrio, se obtuvieron las interacciones importantes, contenidas en la **tabla 24**. El resto de interacciones se presentan en el **anexo 5**.

**Tabla 24.** Interacciones interatómicas del residuo CYT 824 con residuos cercanos en el intervalo de equilibrio.

Punto crítico	Átomo de aminoácido	Átomo de prazol	Rho
1	C (tyr142)	H	0.005108
3	O (tyr142)	H	0.006999
5	O (tyr142)	H	0.00782
26	O (Tyr142)	H	0.005876
28	O (Tyr142)	N	0.003538
29	C (Tyr142)	N	0.002655
6	H (Ala146)	C	0.00655
7	O (Ile816)	H	0.002291
8	H (Phe820)	C	0.003626
11	C (Phe820)	H	0.006018
10	H (Met986)	N	0.005067
16	H (Met986)	C	0.003577
4	H (Phe990)	C	0.006059
30	H (Phe990)	N	0.003715



**Figura 35.** Interacciones principales de la parte del timoprazol del residuo CYT 824 con residuos cercanos.



Además de las interacciones con los residuos antes descritas, durante toda la dinámica del sistema 824 se presentaron varias interacciones de la parte del timoprazol del residuo CYT 824 con las cadenas alifáticas de dos lípidos cercanos, por lo que el ambiente de esta región tuvo una contribución hidrofóbica permanente, que se vio reflejado en menos moléculas de agua interaccionando en dicha región, y un mayor número de residuos interaccionando con la parte del prazol del residuo CYT 824, a comparación de lo observado en el sitio reactivo del residuo CYT 815, descrito anteriormente.

## 8. Conclusiones:

En esta tesis se planteó esclarecer, de manera teórica, el comportamiento químico de 14 prazoles en su proceso de bioactivación, estudiando la formación del ácido sulfénico activo correspondiente a partir de su molécula inicial como profármaco. Por otra parte, se estudió mediante cálculos de dinámica molecular y química cuántica, la manera en que influye la formación de un enlace disulfuro, entre el producto de la transposición de Smiles del timoprazol con las cisteínas 815 y 824, de manera local y global en un modelo de la bomba de protones gástrica humana.

Se determinó el perfil energético de la activación de 14 prazoles hasta la formación de su ácido sulfénico correspondiente, considerando el efecto provocado por sustituciones en los anillos de piridina y de bencimidazol. Los sustituyentes electroattractores en la parte del bencimidazol desestabilizan la conformación reactiva, mientras que el mismo tipo de sustituyentes en el anillo de piridina la estabilizan. El primer paso de la transposición de Smiles es una adición nucleofílica hacia el bencimidazol por la parte de la piridina, la cual depende de la diferencia de la población electrónica de los átomos involucrados en el ataque. El segundo paso produce ácido sulfénico mediante una reacción concertada donde el rompimiento del enlace S-C tiene lugar al mismo tiempo que la migración de un protón, este paso está determinado por la población electrónica del átomo de azufre.

Se encontraron evidencias computacionales de que la formación de la sulfenamida a partir del ácido sulfénico es poco probable, a pesar de que en la literatura se reporte como un proceso químico factible. Se exploró la formación del enlace disulfuro entre el timoprazol, en su forma de sulfenamida, con una cisteína y se encontró que se necesita la presencia explícita de dos moléculas de agua para la formación del enlace disulfuro.

Posteriormente, se modelaron las dos subunidades de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana embebida en una bicapa de fosfolípidos en un ambiente acuoso neutro, partiendo de su secuencia de aminoácidos y un molde correspondiente a una proteína homóloga de cerdo. A partir del modelo que se obtuvo de la bomba de protones gástrica humana se estudiaron las consecuencias locales y globales del efecto del timoprazol unido a las cisteínas 815 y 824.

En el sistema silvestre el esqueleto de la proteína alcanzó un equilibrio conformacional en los últimos 7 ns de simulación, no presentó cambios considerables en su estructura secundaria, ya que en la subunidad  $\alpha$  únicamente incrementaron un 3% las asas y en la subunidad  $\beta$  se incrementaron 9% las láminas. En cuanto a la evaluación estructural, los valores de QMEAN indicaron que la estructura global de la proteína se vio afectada desfavorablemente en los conformeros en el equilibrio y minimizado respecto al inicial. Sin embargo, la energía D-fire se incrementa, indicando que se adopta una conformación energéticamente más favorable los conformeros del equilibrio y minimizado. Esto también se pudo observar en las gráficas de ANOLEA, que mostraron cómo varias regiones desfavorables antes de la dinámica y se mejoraron al alcanzar el equilibrio y en el conformero minimizado. Finalmente, el gráfico de Ramachandran indica que la región de residuos favorables disminuye un 6% y la región permitida incrementa un 7%.

En el sistema 815, donde se sustituyó la cisteína 815 por el residuo CYT, el esqueleto de la proteína alcanzó un equilibrio conformacional en los 8 ns finales de su simulación. Las regiones de residuos con mayores fluctuaciones fueron 1- 37 y 660 – 664 en el tercer intervalo. La estructura secundaria de la subunidad  $\alpha$  que más se modificó, con respecto al conformero inicial, fue la de hélices, que disminuyó un 17% con respecto a la inicial y se incrementaron las asas un 18%. En la subunidad  $\beta$ , se incrementaron las láminas un 11% y disminuyeron las hélices un 8%. Los valores de QMEAN indicaron que la estructura global de la proteína se vio afectada desfavorablemente en el equilibrio y en el conformero respectivo minimizado. Por su parte los valores de D-fire indicaron que las estructuras en el equilibrio y minimizada empeoran, aunque en menor medida ésta última. La gráfica de Ramachandran mostró una disminución de 16% de residuos en la región favorable, un incremento de 15% en la permitida. Por lo tanto la estructura global de la proteína empeora energéticamente y adquiere una estructura irregular respecto a la inicial.

En el sistema 824, donde el residuo CYT se encuentra en la posición de la cisteína 824, se alcanza el equilibrio conformacional del esqueleto de la proteína en los últimos 7.5 ns, teniendo a los residuos 1-19 y 420 con las mayores fluctuaciones. La estructura secundaria cambió en la subunidad  $\alpha$  principalmente en las hélices, que disminuyeron un 20% y se incrementaron las asas un 13%. En la subunidad  $\beta$  las láminas incrementaron un 11% y las hélices disminuyeron un 11%. Los valores de QMEAN indicaron que indicaron que la estructura global de la proteína se vio afectada desfavorablemente en el equilibrio y en el conformero minimizado. Los valores de D-fire mostraron que el conformero en el equilibrio se desestabilizó respecto al inicial y el conformero minimizado se favoreció energéticamente más que el conformero inicial. Según la gráfica de Ramachandran la región favorable de residuos disminuyó un 11% y la región permitida se incremento un 11%. Por lo tanto el conformero minimizado se favorece energéticamente según D-Fire aunque adquiera una conformación irregular respecto a la inicial.

El sitio reactivo del producto de la transposición de Smiles del timoprazol con la cisteína 815, en los conformeros minimizados inicial y del equilibrio, se caracterizó por la presencia de interacciones con los residuos asparagina 140, valina 333 y leucina 811 en un ambiente hidrofílico.

Por su parte, el sitio reactivo del producto de la transposición de Smiles del timoprazol con la cisteína 824, en los conformeros minimizados inicial y del equilibrio, se caracterizó por la presencia de interacciones con los residuos tirosina 142, isoleucina 816 y fenilalanina 820 en un ambiente menos hidrofílico que en la cisteína 815 y con interacciones constantes con cadenas alifáticas de fosfolípidos cercanos.

En general, las fluctuaciones del residuo CYT en las posiciones 815 y 824 disminuyeron, debido a las interacciones que presentó con los residuos cercanos, moléculas de agua y fosfolípidos. Esta falta de flexibilidad afectó la estructura secundaria de los sistemas 815 y 824, obteniéndose conformeros estructuralmente menos regulares que el sistema silvestre. Esto puede provocar un cambio en el equilibrio conformacional involucrado en el transporte de protones.

Finalmente, se puede decir que esta tesis realizó un estudio completo de los inhibidores de la bomba de protones, desde su activación hasta las perturbaciones locales y globales que su presencia provoca en la estructura de un modelo de la  $H^+/K^+$  ATPasa gástrica humana.

## 9. Bibliografía.

- <sup>1</sup> Sascha K, Geibel J. Gastric Acid, Calcium Absorption, and Their Impact on Bone Health. *Physiological Reviews*. **2013**, 93, 189-268.
- <sup>2</sup> Abe K, Tani K. Conformational rearrangement of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induced by an acid suppressant. *Nature Communications*. **2011**, 2:155, 1-7.
- <sup>3</sup> Sachs G, Chang H, Rabon E, Schackman R, Lewin M, Saccomani G. A nonelectrogenic H<sup>+</sup> pump in plasma membranes of hog stomach. *Journal of Biological Chemistry*. **1976**, 251,7690–7698.
- <sup>4</sup> Shin J, Munson K, Vagin O, Sachs G. The gastric H<sup>+</sup>K-ATPase: structure, function, and inhibition. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. **2009**, 457:3, 609-622.
- <sup>5</sup> Sawaguchi A, Aoyama F, Ide S, Suganuma T. The cryofixation of isolated rat gastric mucosa provides new insights into the functional transformation of gastric parietal cells: an in vitro experimental model study. *Archives of Histology and Cytology*. **2005**, 68:151–160.
- <sup>6</sup> Wallmark B, Lorentzon P, Sachs G. The gastric H<sup>+</sup>, K(+)-ATPase. *Journal of Internal Medicine*. *Supplement*. **1990**, 732, 3–8.
- <sup>7</sup> Ganser, A & Forte, J. K<sup>+</sup>-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxynic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1973**, 307, 169–180.
- <sup>8</sup> Post R & Kume S. Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. **1973**, 248, 6993–7000.
- <sup>9</sup> Rabon E & Reuben M. The mechanism and structure of the gastric H,K-ATPase. *Annual Review of Physiology*. **1990**, 52, 321–344.
- <sup>10</sup> Dürr K, Abe K, Tavraz N, Friedrich T. E2P state stabilization by the N-terminal tail of the H,K-ATPase  $\beta$ -subunit is critical for efficient proton pumping under *in vivo* conditions. *Journal of Biological Chemistry*. **2009**, 284, 20147–20154.
- <sup>11</sup> Sachs G, Shin J, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I & Munson, K. The Gastric H,K ATPase as a Drug Target. Past, Present, and Future. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **2007**, 41, S226–S242.
- <sup>12</sup> Abe K, Kaya S, Taniguchi K, Hayashi Y, Imagawa T, Kikumoto M, Oiwa K, Sakaguchi K. Evidence for a relationship between activity and the tetraprotomeric assembly of solubilized pig gastric H/K-ATPase. *Journal of Biochemistry*. **2005**, 138, 293–301.
- <sup>13</sup> Palmgren M, Axelsen K. Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1998**, 1365, 37–45.
- <sup>14</sup> Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H & Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*. **2000**, 405, 647–655.
- <sup>15</sup> Chow D, Browning C, & Forte J. Gastric H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity is inhibited by reduction of disulfide bonds in  $\beta$ -subunit. *American Journal of Physiology*. **1992**, 263, C39–C46.
- <sup>16</sup> Lutsenko S, & Kaplan J. An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry*. **1993**, 32, 6737–6743.
- <sup>17</sup> Chow D, & Forte J. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *Journal of Experimental Biology*. **1995**, 198, 1–17.
- <sup>18</sup> Abe K, Tani K, Nishizawa T. & Fujiyoshi Y. Inter-subunit interaction of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycles. *EMBO Journal*. **2009**, 28, 1637–1643.
- <sup>19</sup> Sweadner K, Donnet C. Structural similarities of Na,KATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*. **2001**, 356, 685–704.
- <sup>20</sup> Dürr K, Tavraz N, Dempski R, Bamberg E, and Friedrich T. Functional Significance of E2 State Stabilization by Specific  $\alpha/\beta$ -Subunit Interactions of Na,K- and H,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. **2009**, 284, 3842–3854.
- <sup>21</sup> Abe K, Tani K, Nishizawa T, Fujiyoshi Y. Inter-subunit interaction of gastric H,K- ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle. *EMBO Journal*. **2009**, 28, 1637–1643.
- <sup>22</sup> Maeda M, Oshiman K, Tamura S, Futai M. Human gastric-ATPase gene. Similarity to (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase genes in exon/intron organization but difference in control region. *Journal of Biological Chemistry*. **1990**, 265, 9027–9032.
- <sup>23</sup> Shyjan A, Canfield V, Levenson R. Evolution of the Na,K- and H-K-ATPase beta subunit gene family: structure of the murine Na-K-ATPase beta 2 subunit gene. *Genomics*. **1991**, 11, 435–442.
- <sup>24</sup> Munson K, Law R, Sachs G. Analysis of the gastric H,K ATPase for ion pathways and inhibitor binding sites. *Biochemistry*. **2007**, 46, 5398–5417.

- <sup>25</sup> Olesen C, Picard M, Winther AML, Gyrop C, Morth JP, Oxvig C, Moller JV, Nissen P. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*. **2007**, 450, 1036–1042.
- <sup>26</sup> Toyoshima C, Nomura H, Sugita Y. Crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in various physiological states. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2003**, 986: 1–8.
- <sup>27</sup> Munson K, Garcia R & Sachs G. Inhibitor and ion binding sites on the gastric H,K-ATPase. *Biochemistry*. **2005**, 44, 5267–5284.
- <sup>28</sup> Kaminski J, Bristol J, Puchalski C, Lovey R, Elliott A, Guzik H, Solomon D, Conn D, Domalski M, and Wong S. Antiulcer agents. I. Gastric antisecretory and cytoprotective properties of substituted imidazo[1,2-a]pyridines. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1985**, 28, 876-892.
- <sup>29</sup> Kaminski J, Wallmark B, Briving C, and Andersson B. Antiulcer agents. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by substituted imidazo[1,2-a]pyridines and related analogues and its implication in modeling the high affinity potassium ion binding site of the gastric proton pump enzyme. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1991**, 34, 533-541.
- <sup>30</sup> Berg A, Böttcher G, Andersson K, Carlsson E, Lindström A, Huby R, Håkansson H, Skånberg-Wilhelmsson I, and Hellmold H. Early stellate cell activation and veno-occlusive-disease (VOD)-like hepatotoxicity in dogs treated with ARH047108, an imidazopyridine proton pump inhibitor. *Toxicologic Pathology*. **2008**, 36,727–737.
- <sup>31</sup> Shin J, Cho Y and Sachs G. Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) -ATPase by proton pump inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 7800–7811.
- <sup>32</sup> Shin J, Vagin O, Munson K, Kidd M, Modlin I, Sachs G. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2008**, 65:264–281.
- <sup>33</sup> Wallmark B, Sachs G, Mardh S and Fellenius E. Inhibition of gastric (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase by the substituted benzimidazole, picoprazole. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1983**, 728, 31–38.
- <sup>34</sup> Fellenius E, Berglindh T, Sachs G, Olbe L, Elander B, Sjostrand S and Wallmark B. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase. *Nature*. **1981**, 290, 159–161.
- <sup>35</sup> Shin J, Grundler G, Senn-Bilfinger J, Simon W, Sachs G. Functional consequences of the oligomeric form of the membranebound gastric H,K-ATPase. *Biochemistry*. **2005**, 44,16321–16332.
- <sup>36</sup> Asano S, Yoshida A, Yashiro H, Kobayashi Y, Morisato A, Ogawa H, Takeguchi N, Morii M. The cavity structure for docking the K-competitive inhibitors in the gastric proton pump. *Journal of Biological Chemistry*. **2004**, 279, 13968–13975.
- <sup>37</sup> Lindberg P, Nordberg P, Alminger T, Brandstrom A, Wallmark B. The mechanism of action of the gastric acid inhibitor omeprazole. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1986**, 29, 1327-1329.
- <sup>38</sup> Besancon M, Shin J, Mercier F, Munson K, Miller M, Hersey S and Sachs G. Membrane topology and omeprazole labeling of the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*. **1993**, 32, 2345–2355.
- <sup>39</sup> Sachs G, Shin J, Besancon M and Prinz C. The continuing development of gastric acid pump inhibitors. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. **1993**, 7, 4–12.
- <sup>40</sup> Shin J, Homerin H, Domagala F, Fichoux H and Sachs G. Characterization of the inhibitory activity of tenatoprazole on the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*. **2006**, 71, 837–849.
- <sup>41</sup> Shin J, Besancon M, Simon A and Sachs G. The site of action of pantoprazole in the gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1993**, 1148, 223–233.
- <sup>42</sup> Shin J and Sachs G. Differences in binding properties of two proton pump inhibitors on the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in vivo. *Biochemical Pharmacology*. **2004**, 68, 2117–2127.
- <sup>43</sup> Cortés F., Cuevas G., *Introducción a la química computacional*. Editorial Fondo de Cultura Económica. 2003.
- <sup>44</sup> Rezáč J, Fanfrlík J, Salahub D. Semiempirical quantum chemical PM6 method augmented by dispersion and H-bonding correction terms reliably describes various types of noncovalent complexes. *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2009**, 5:7, 1749-1760.
- <sup>45</sup> Zhao Y, and Truhlar D. Density functional with broad applicability in chemistry. *Accounts of Chemical Research*, **2008**, 41:2, 157-67.
- <sup>46</sup> Zhao Y, and Truhlar D. The M06 suite of density functional for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functional and systematic testing of four M06-class functional and 12 other function. *Theoretical Chemistry Accounts*. **2007**, 120:1-3, 215-241.

- <sup>47</sup> R. F. W. Bader. *Atoms in molecules: A quantum Theory* (International Series Of Monographs On Chemistry). Oxford University Press, USA, 1st edition, **1994**.
- <sup>48</sup> MacKerell A, Bashford D, Bellott M, Dunbrack R, Evanseck J, Field M, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau F, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen D, Prodhom B, Reiher I, Roux, B, Schlenkrich M, Smith J, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorcikiewicz–Kuczera J, Yin D, Karplus M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *Journal of Physical Chemistry B*. **1998**, 102, 3586.
- <sup>49</sup> Weiner S, Kollman P, Case D, Singh U, Ghio C, Alagona G, Profeta J, Weiner P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*. **1984**, 106, 765.
- <sup>50</sup> Berendsen H, van der Spoel D, van Drunen R, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*. **1995**, 91, 43.
- <sup>51</sup> Weiner P, Kollman P. AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modeling Molecules and Their Interactions *Journal of Computational Chemistry*. **1981**, 2, 287-303.
- <sup>52</sup> Carugo O, Pongor S, A Normalized Root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Science*. **2001**, 10, 1470-1473.
- <sup>53</sup> Fuglebakk E, Echave J, Reuter N, Measuring and comparing structural fluctuation patterns in large protein datasets. *Bioinformatics*. **2012**, 28:19, 2431-2440.
- <sup>54</sup> Melo F, Feytmans E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *Journal of Molecular Biology*. **1998**, 277:5, 1141-1152.
- <sup>55</sup> Zhou H, Zhou Y. Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. *Protein Science*. **2002**, 11, 2714-2726.
- <sup>56</sup> Laskowski R, MacArthur M, Moss D and Thornton J. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. **1993**, 26, 283-291.
- <sup>57</sup> Benkert P, Tosatto S and Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **2008**, 71, 261-277.
- <sup>58</sup> Cavassotto C, Phatak S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discovery Today*. **2009**, 14, 676-683.
- <sup>59</sup> Krieger E, et al. Homology modeling. *Structural Bioinformatics*, **2003**, 25.
- <sup>60</sup> Frisch M, Trucks G, Schlegel H, Scuseria G, Robb M, Cheeseman J, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson G, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian H, Izmaylov A, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg J, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery J, Peralta J, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd J, Brothers E, Kudin K, Staroverov V, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant J, Iyengar S, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam J, Klene M, Knox J, Cross J, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann R, Yazyev O, Austin A, Cammi R, Pomelli C, Ochterski J, Martin R, Morokuma K, Zakrzewski V, Voth G, Salvador P, Dannenberg J, Dapprich S, Daniels A, Farkas Ö, Foresman J, Ortiz J, Cioslowski J, Fox D. Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- <sup>61</sup> Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews*. **2005**, 105, 2999-3093.
- <sup>62</sup> Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Se consultó en diciembre de 2012.
- <sup>63</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2> Se consultó en diciembre de 2012.
- <sup>64</sup> <http://salilab.org/modeller/> Se consultó en diciembre de 2012.
- <sup>65</sup> <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/science/membrane>. Se consultó en diciembre de 2012.
- <sup>66</sup> <http://utopia.duth.gr/~glykos/Carma.html> Se consultó en diciembre de 2012.
- <sup>67</sup> <http://www.swissparam.ch/> Se consultó en diciembre de 2012.
- <sup>68</sup> <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> Se consultó en noviembre de 2013.
- <sup>69</sup> <http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization-download.php> Se consultó en noviembre de 2013.
- <sup>70</sup> <http://www.chemistry.mcmaster.ca/bader/aim/> Se consultó en noviembre de 2013.
- <sup>71</sup> Truce W, Ray W, Norman O, Eickemeyer D. Rearrangements of Aryl Sulfones. I. The Metalation and Rearrangement of Mesityl Phenyl Sulfone *J. Am. Chem.Soc.* **1958**, 80, 3625.

- <sup>72</sup> Truce W, Kreiderand E, Brand W. The Smiles and Related Rearrangements of Aromatic Systems. *Organic Reactions*. **1970**, 18, 99-215.
- <sup>73</sup> Rodig O, Collier R, Schlatter R, Pyridine Chemistry. I. The Smiles Rearrangement of the 3-Amino-2, 2'-Dipyridyl Sulfide System. *Journal of Organic Chemistry*. **1964**, 29, 2652-2658.
- <sup>74</sup> Bunnett J, Zahler R. Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions. *Chemical Reviews*. **1951**, 49, 273-412.
- <sup>75</sup> Nagai T, Fukushima Y, Kuroda T, Shimizu H, Sekiguchi S, Matsui K, Rearrangement of 2-Aryloxybenzazoles. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **1973**, 46, 2600.
- <sup>76</sup> Brändström A, Lindberg P, Bergman N, Alminger T, Ankner K, Junggren U, Lamm B, Nordberg P, Erickson M, Grundevik I, Hagin I, Hoffman K, Johansson S, Larsson S, Löfberg I, Ohlson K, Persson B, Skånberg I, Tekenbergs-Hjelte L. Chemical Reactions of Omeprazole and Omeprazole Analogues. I. A Survey of the Chemical Transformations of Omeprazole and its Analogues. *Acta Chemica Scandinavica* **1989**, 43, 536-548.
- <sup>77</sup> Shin J, Cho Y, Sachs G. Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase by proton pump inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 7800-11.
- <sup>78</sup> Al-Matar A, El-Eswed B, Tutunji M. Kinetics of acid degradation of proton pump inhibitors in the presence of a thiol. *International Journal of Chemical Kinetics*. **2009**, 41, 498-506.
- <sup>79</sup> Ohishi H, In Y, Ishida T, Inoue M, Sato F, Okitsu M, Ohno T. Structure of 5-methoxy-2-[[4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridinylmethyl]sulfinyl]-1H-benzimidazole (omeprazole). *Acta Crystallographica*. **1989**, C45, 1921-1923.
- <sup>80</sup> Swamy G, Ravikumar K. Crystal structure of lansoprazole sulfone. *Journal of Structural Chemistry*. **2007**, 48, 715-718.
- <sup>81</sup> Bader R. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, **1990**
- <sup>82</sup> Popelier P. *Atoms in Molecules: An Introduction*, Prentice Hall, London, **2000**.
- <sup>83</sup> Matta C, Boyd R. *The Quantum Theory of Atoms in Molecules: From Solid State to DNA and Drug Design*, WILEY - VCH, Weinham, **2007**.
- <sup>84</sup> Bader R, Essen H. The characterization of atomic interactions. *Journal of Chemical Physics*. **1984**, 80, 1943-1960.
- <sup>85</sup> Bader R, Gillespie R, MacDougall P. *The Laplacian of the Charge Density-The Physical Basis of the VSEPR Model, in: Molecular Structure and Energetics* (Eds: J. F. Liebman, A. Greenberg), VCH Publishers Inc., Fla., **1989**.
- <sup>86</sup> Werstiuk N, Laidig K, Ma J. *Application of Quantum Theory of Atoms in Molecules to Study of Anomeric Effect in Dimethoxymethane in: The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects* (Ed: G. R. J. Thatcher) ACS symposium series, American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.
- <sup>87</sup> Hayashi K, Ogawa S, Sano S, Shiro M, Yamaguchi K, Sei Y, Nagao Y. Intramolecular nonbonded S...N interaction in rabeprazole. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2008**, 56, 802-806.
- <sup>88</sup> Cortés F, Bader R. Complementarity of QTAIM and MO theory in the study of bonding in donor-acceptor complexes. *Coordination Chemical Reviews*. **2005**, 249, 633-662.
- <sup>89</sup> Menger F, Gallowaya A, Musaev D. Relationship between rate and distance. *Chemical Communications*. **2003**, 18, 2370-2371.
- <sup>90</sup> Biegler-König F, Bader R, Tang T. Calculation of the Average Properties of Atoms in Molecules. II. *Journal of Computational Chemistry*. **1982**, 13, 317-328.
- <sup>91</sup> Ife R, Dyke C, Keeling D, 2-[[4-Amino-2-pyridyl)methyl]sulfinyl]benzimidazole H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors. The relationship between pyridine basicity, stability, and activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1989**, 32, 1970-1977.
- <sup>92</sup> Suschitzky J, Wellsin E. *Comprehensive Medical Chemistry*, Vol. 5 (Ed: C. Hansch), Pergamon Press, Oxford, **2005**, 197-202.
- <sup>93</sup> Bayse C. Transition states for cysteine redox processes modeled by DFT and solvent-assisted proton Exchange, *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2011**, 9, 4748.
- <sup>94</sup> Benkert P, Bieasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. **2011**, 27, 343-350.

## Anexos.

**Anexo 1.** Ejemplo del archivo de entrada de la dinámica molecular de 50 ns para la equilibración de cada uno de los sistemas estudiados.

```
## JOB DESCRIPTION
# Eq. of protein embedded in POPC
# membrane, ions and water.
# Protein released. PME, Constant
#Pressure/Area.

## ADJUSTABLE PARAMETERS
structure      atpasa_825_popcwi.psf
coordinates    atpasa_825_popcwi_03.pdb
outputName     atpasa_825_popcwi-04
set temperature 310
firsttimestep  0

## SIMULATION PARAMETERS
# Input
paraTypeCharmm      on
parameters          par_all27_prot_lipid_na.inp

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1 176.2 0. 0.
cellBasisVector2 0. 176.5 0.
cellBasisVector3 0. 0. 171.
cellOrigin       -0.044 -0.051 -4.010
wrapWater        on
wrapAll          on

# Force-Field Parameters
exclude          scaled1-4
1-4scaling       1.0
cutoff           12.0
switching        on
switchdist       10.0
pairlistdist     13.5

# Integrator Parameters
timestep         2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds       all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq   1
fullElectFrequency 2
stepspercycle    20

# PME (for full-system periodic electrostatics)
if {1} {
PME              yes
PMEGridSizeX    200
PMEGridSizeY    200
PMEGridSizeZ    200
}

# Constant Temperature Control
langevin         on ;# do langevin dynamics
langevinDamping  1 ;# damping coefficient
# (gamma) of 5/ps
langevinTemp     $temperature

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {1} {
useGroupPressure yes ;# needed for 2fs steps
useFlexibleCell  yes ;# no for water box, yes
#for membrane
useConstantArea  yes ;# no for water box, yes
#for membrane

langevinPiston  on
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 200.
langevinPistonDecay 50.
langevinPistonTemp $temperature
}

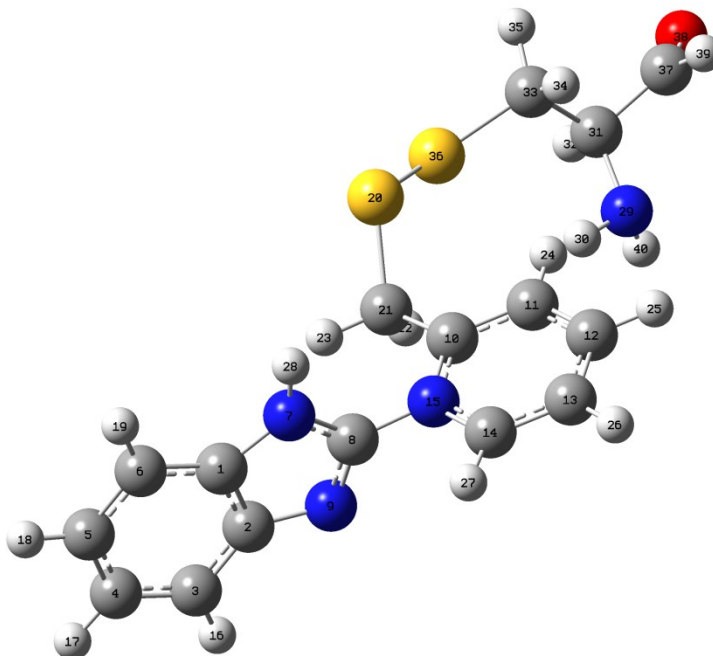
restartfreq      1000 ;# 1000steps = every 2ps
dcdfreq         1000
xstFreq         1000
outputEnergies  50
outputPressure   50

## EXECUTION SCRIPT
run 25000000 ;# 50 ns
```



## Anexo 2. Parametrización del residuo CYT.

El residuo CYT se construyó enlazando covalentemente el producto de transposición de Smiles del timoprazol con una cisteína, para obtener la molécula que se presenta en la **figura 36**:



**Figura 36.** Estructura molecular del residuo CYT.

La molécula del residuo CYT se envió al sitio de parametrización de ligandos swissparam, para obtener sus archivos de topología y parámetros correspondientes, compatibles con el campo de fuerza CHARMM27, para realizar las dinámicas moleculares de los sistemas 815 y 824.

El residuo CYT, que posee una carga positiva debido al enlace que une al carbono del anillo de bencimidazol con el átomo de nitrógeno de la piridina, se solvató añadiendo moléculas de agua tipo TIP3 en un cubo a 10 Å de distancia y se añadió un átomo de ión cloruro para que el sistema se neutralizara.

Inicialmente, el sistema, excepto la molécula del residuo CYT, se minimizó a una temperatura de 0° K, durante 10000 pasos.

A partir de las coordenadas atómicas del sistema anterior, se realizó una dinámica de 30 ps del sistema excepto el residuo CYT.

El siguiente paso consistió en someter el sistema resultante del paso anterior a una dinámica molecular de 100 ps, partiendo de una temperatura de 10° K y finalizando con una de 310° K.

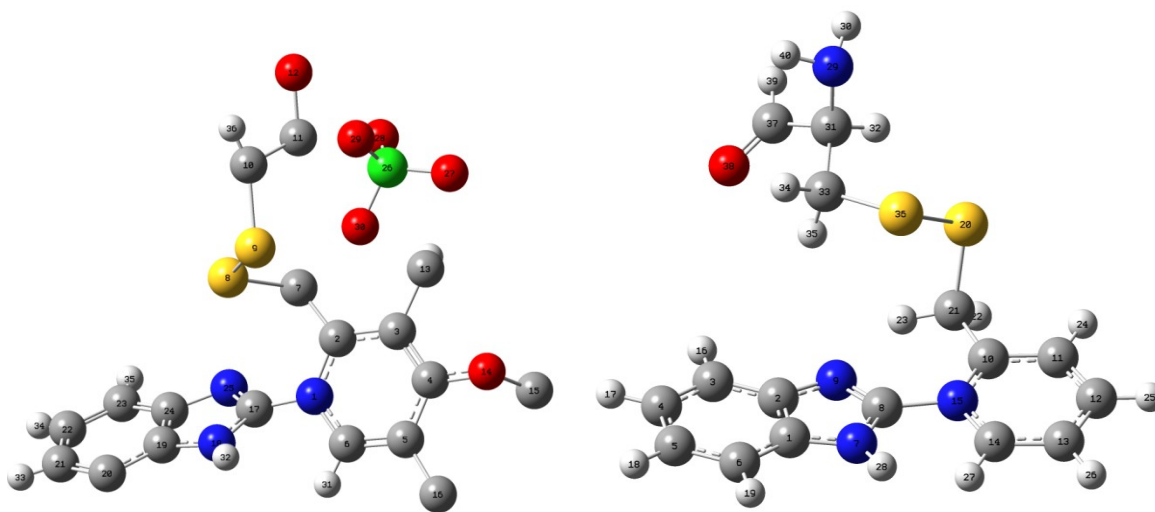
Las coordenadas atómicas resultantes del paso anterior se sometieron a una dinámica de 30 ps a 310° K y presión constante de una atmósfera.

El sistema resultante del paso anterior se sometió a una dinámica de 2 ns a una temperatura constante de 310° K y volumen constante.

Se realizó un agrupamiento de cuadros al archivo de trayectoria del paso anterior y se obtuvo como estructura representativa de la dinámica de 2 ns, al cuadro 51, con 74 miembros similares estructuralmente.

El paso final fue minimizar durante 100000 pasos el sistema que se obtuvo en el paso anterior, a 0° K y la estructura resultante se tomó como referencia para compararla con datos estructurales experimentales.

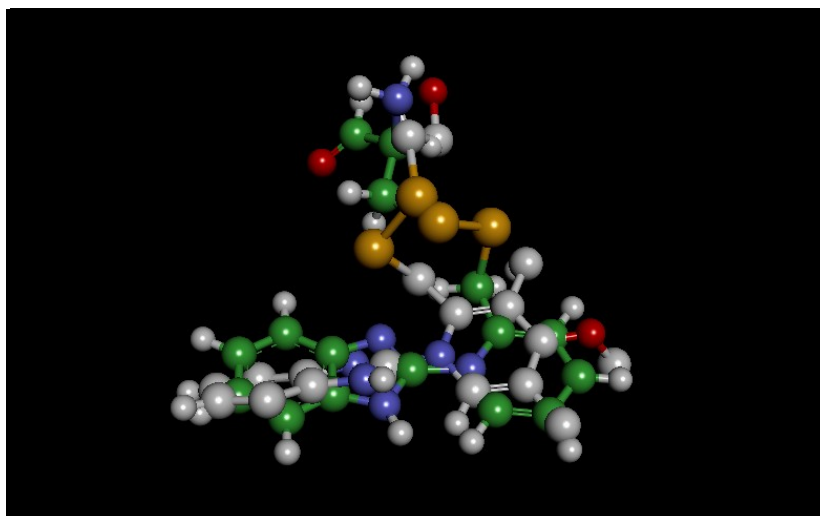
Se realizó una búsqueda de cristales de alguna molécula similar al residuo CYT y se encontró el cristal del compuesto 2-((1-(Bencimidazol-2-yl)-4-metoxi-3,5-dimetil-piridinio-2-il)-metileno-ditio)-etanol perclorato, con la estructura molecular que se presenta en la **figura 37**.



**Figura 37.** Estructuras moleculares del producto de la transposición de Smiles del omeprazol ligado, mediante un enlace disulfuro al  $\beta$ -mercapto etanol y del timoprazol con una cisteína.

Esta estructura se obtuvo de la reacción de  $\beta$ -mercaptoetanol con el omeprazol en condiciones ácidas. Posteriormente se tomó la estructura del residuo CYT minimizada para

compararla con la del cristal y se realizó un empalme de estructuras, obteniendo un valor de similitud (overlay similarity) de 0.704829. El empalme se muestra en la **figura 38**:



**Figura 38.** Empalme de las estructuras moleculares del residuo CYT con la especie activa del omeprazol enlazada con  $\beta$ -mercaptoetanol. Los átomos de carbono de color verde pertenecen al residuo CYT.

Posteriormente se realizó la medición de algunos parámetros estructurales de ambas estructuras, que se pueden observar en las tablas **26** y **27**. Los átomos enlistados en la tabla corresponden a la numeración atómica de la estructura cristalina del la especie activa del omeprazol enlazado al  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Tabla 25.** Comparación de distancias interatómicas del residuo CYT y el cristal del omeprazol.

	CYT	omeprazol	CYT	omeprazol
d1	S20-S36	S8-S9	2.05393	2.01975
d2	C8-N15	C17-N1	1.55198	1.42067
d3	N9-C8	N25-C17	1.32028	1.30938
d4	C8-N7	C17-N18	1.36685	1.3562
d5	C21-S20	C7-S8	1.82031	1.83876
d6	S36-C33	S9-C10	1.8245	1.84226
d7	C2-C1	C24-C19	1.39355	1.40797
d8	C10-C21	C2-C7	1.51222	1.48413
d9	N15-C10	N1-C2	1.37601	1.37445
d10	C33-C31	C10-C11	1.53668	1.50918
d11	C2-N9	C24-N25	1.37737	1.40662
d12	C1-N7	C19-N18	1.36074	1.36871
d13	N15-C14	N1-C6	1.36107	1.33756
d14	C10-C11	C2-C3	1.40987	1.39313
d15	C11-C12	C3-C4	1.39505	1.35167
d16	C12-C13	C4-C5	1.3901	1.4253
d17	C13-C14	C5-C6	1.39967	1.36631
d18	C2-C3	C23-C24	1.39951	1.38273
d19	C3-C4	C22-C23	1.39998	1.37394
d20	C4-C5	C21-C22	1.3977	1.39625
d21	C5-C6	C20-C21	1.39774	1.36399
d22	C1-C6	C19-C20	1.39285	1.40208

Filas = distancias	22
Columnas = moléculas	2
Grados de libertad =	21
chi cuadrada de tabla =	32.7
chi cuadrada de prueba =	0.02036771

**Tabla 26.** Comparación de ángulos del residuo CYT y el cristal del omeprazol.

	lig	ome	lig (obs)	ome (esp)
a1	N9-C8-N7	N25-C17-N18	113.48712	113.49062
a2	N9-C8-N15	N25-C17-N1	124.65218	124.9732
a3	C8-N15-C10	C17-N1-C2	126.55824	122.35299
a4	N15-C10-C21	N1-C2-C7	125.92803	118.73406
a5	N15-C10-C11	N1-C2-C3	119.34288	117.61921
a6	C10-C21-S20	C2-C7-S8	112.78718	115.45864
a7	C21-S20-S36	C7-S8-S9	103.11007	104.3443
a8	S20-S36-C33	S8-S9-C10	101.75907	104.91728
a9	C2-N9-C8	C24-N25-C17	103.2767	104.68953
a10	C1-N7-C8	C19-N18-C17	106.86106	107.42131
a11	S36-C33-C31	S9-C10-C11	112.58177	111.61506
a12	N9-C2-C1	N25-C24-C19	111.45301	108.92424
a13	N7-C1-C2	N18-C19-C24	104.88506	105.46
a14	C6-C1-N7	C20-C19-N18	131.69262	132.51784
a15	C6-C1-C2	C20-C19-C24	123.41104	122.00396
a16	C5-C6-C1	C21-C20-C19	116.71442	116.33705
a17	C4-C5-C6	C22-C21-C20	121.34203	121.89416
a18	C3-C4-C5	C23-C22-C21	120.64768	121.99179
a19	C2-C3-C4	C24-C23-C22	118.94311	117.57572
a20	N9-C2-C3	N25-C24-C23	129.60572	130.94985
a21	C3-C2-C1	C23-C24-C19	118.9397	120.10648
a22	C10-C11-C12	C2-C3-C4	121.4828	120.17655
a23	C11-C12-C13	C3-C4-C5	117.77416	122.19537
a24	C12-C13-C14	C4-C5-C6	119.93375	114.7451
a25	N15-C14-C13	N1-C6-C5	121.88725	123.61492
a26	C8-N15-C14	C17-N1-C6	113.89308	116.13158
a27	C21-C10-C11	C7-C2-C3	114.70091	123.6223

Filas = distancias =	27
Columnas = moléculas =	2
Grados de libertad =	26
chi cuadrada de tabla =	38.9
chi cuadrada de prueba =	2.07102037

En ambos casos se cumple lo siguiente:

H0	Los parámetros son iguales
H1	No todos los parámetros son iguales
<b>si prueba &lt; tabla = Ho se acepta</b>	
si prueba > tabla = Ho se rechaza	

### Anexo 3. Detalles de la regresión lineal de las gráficas A y B de la figura 19.

**Tabla 27.** Estadísticas de la regresión de la gráfica A

Coefficiente de correlación múltiple	0.88630503
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.7855366
R <sup>2</sup> ajustado	0.77123904
Error típico	1.26257378
Observaciones	17
F	54.9420039
Suma de cuadrados de residuos	23.9113883
Promedio de los cuadrados de residuos	1.59409255

**Tabla 28.** Estadísticas de la regresión de la gráfica B

Coefficiente de correlación múltiple	0.96427138
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.92981929
R <sup>2</sup> ajustado	0.92442078
Error típico	0.21264488
Observaciones	15
F	172.236097
Suma de cuadrados de residuos	0.58783197
Promedio de los cuadrados de residuos	0.04521784

#### Anexo 4: Resultados de QMEAN, ANOLEA y Ramachandran.

Confórmero inicial del sistema silvestre:

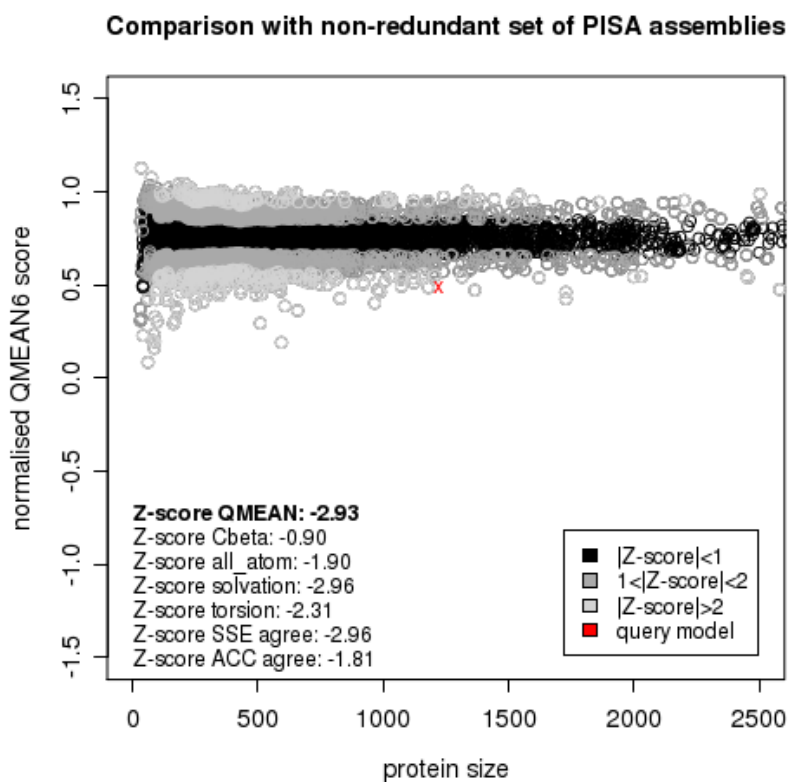


Figura 39. Valores de QMEAN del confórmero inicial del sistema silvestre.

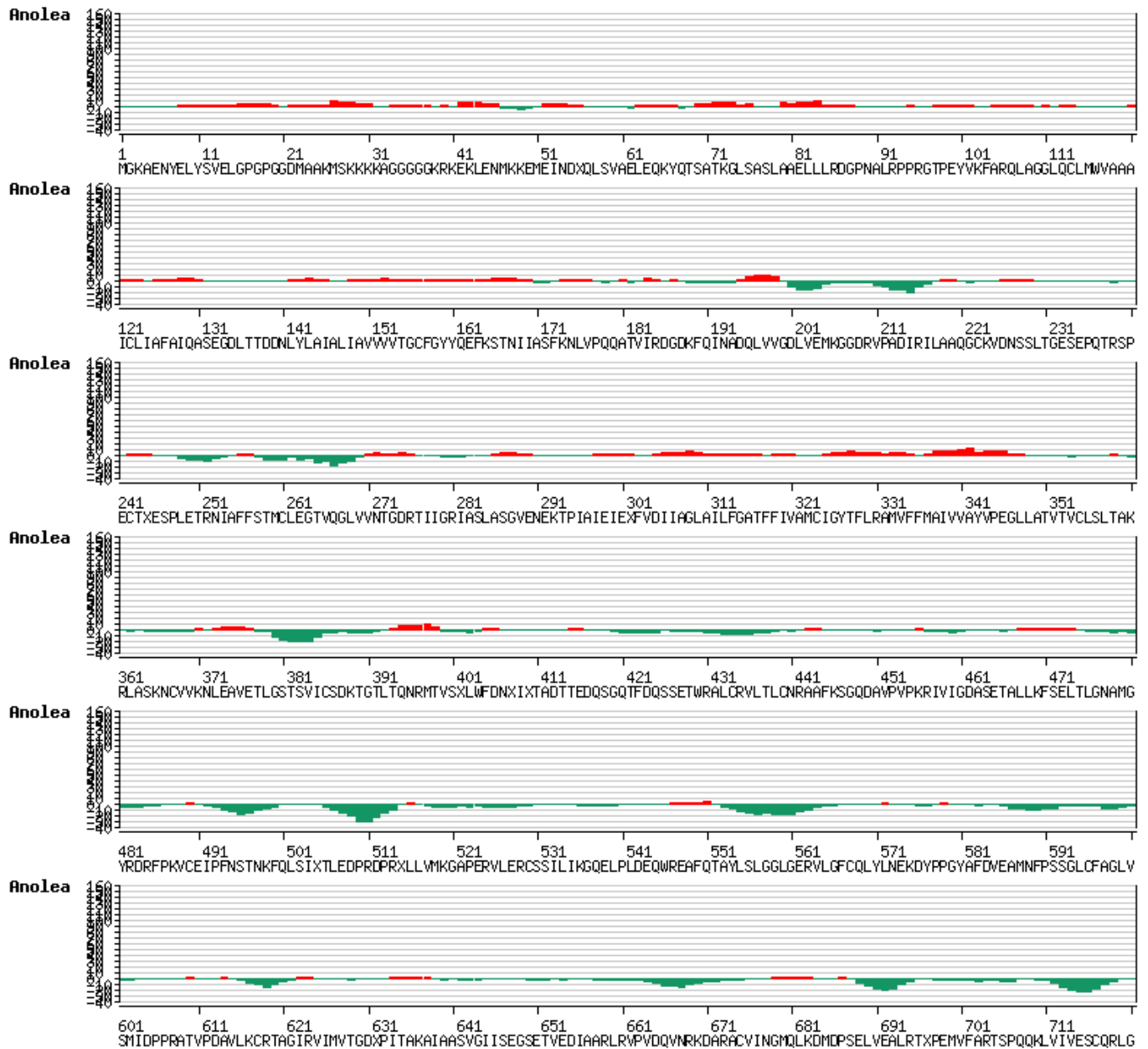


Figura 40\_1. Gráfica de ANOLEA del conformero inicial del sistema silvestre.



Confórmero inicial del sistema silvestre (continuación):

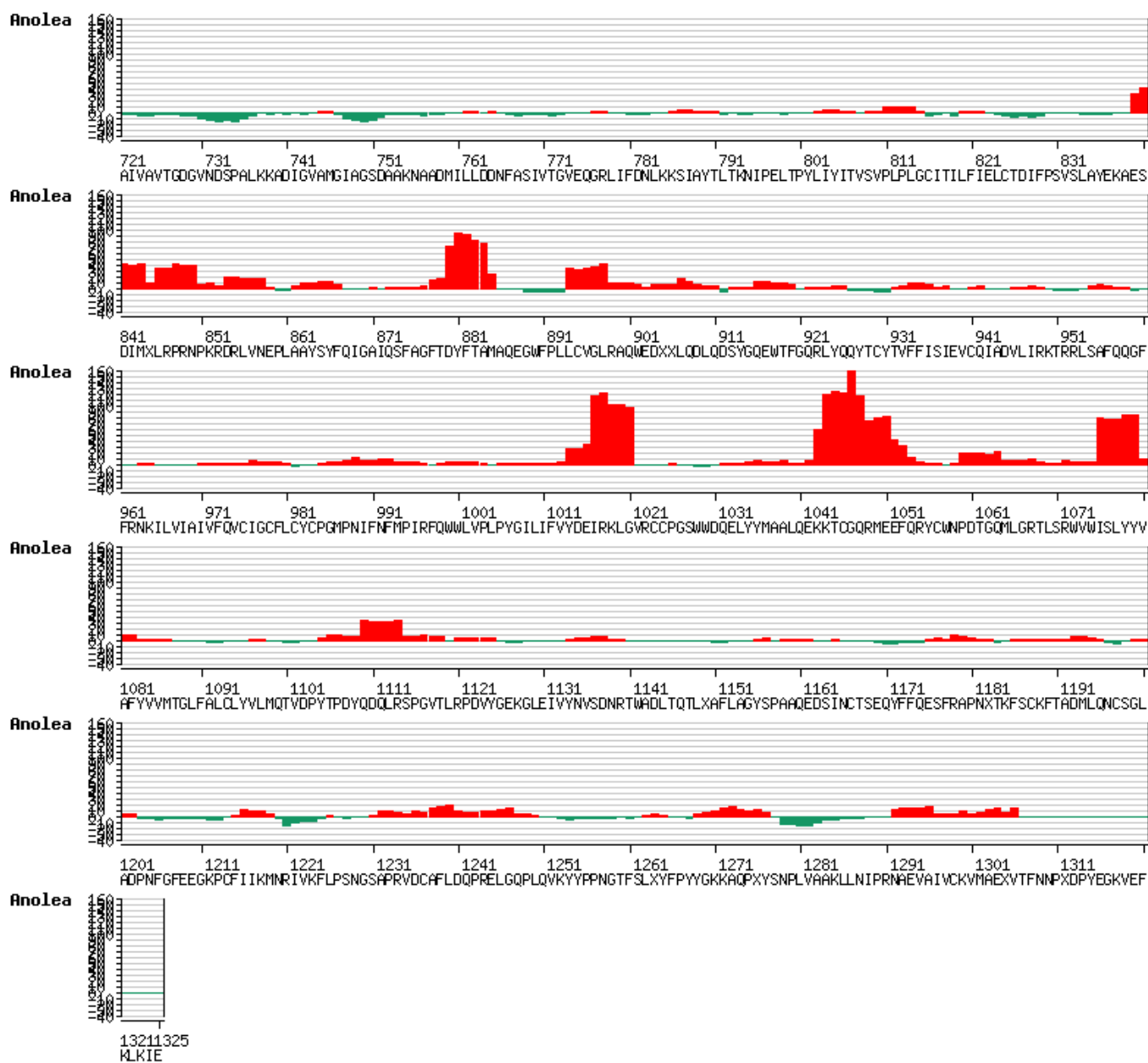
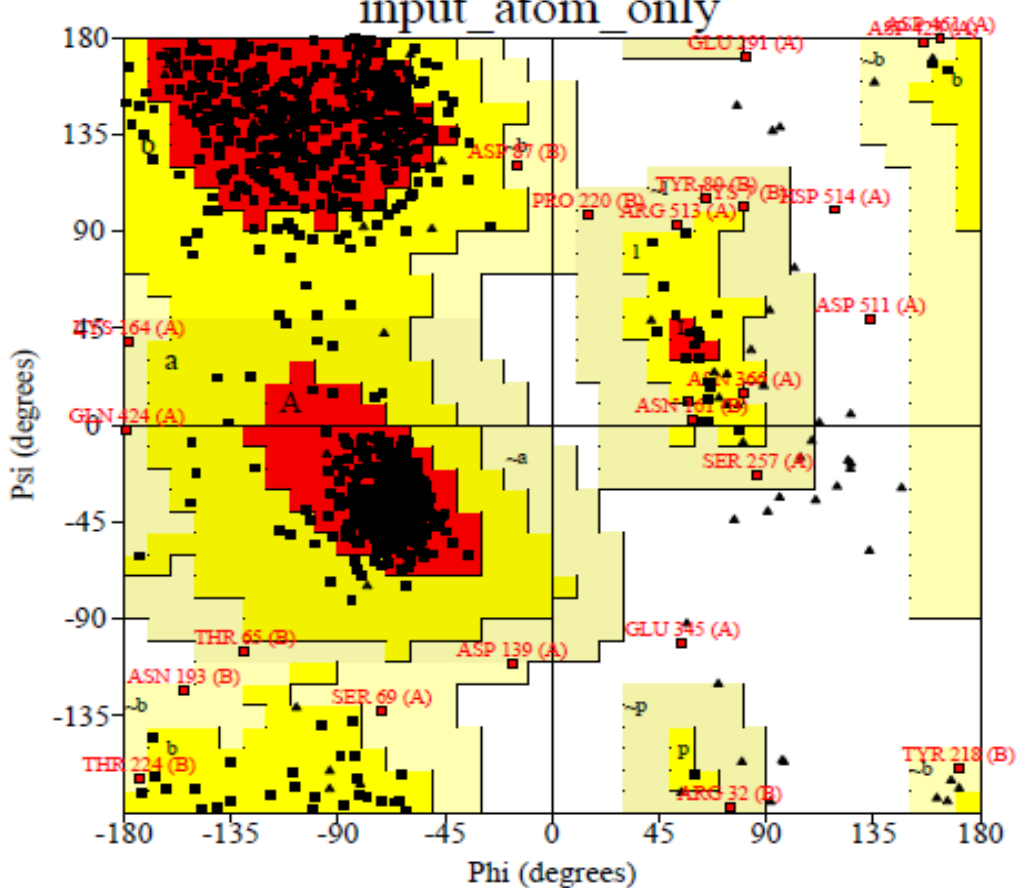


Figura 40\_2. Gráfica de ANOLEA del confórmero inicial del sistema silvestre. (continuación).

# Ramachandran Plot

input\_atom\_only



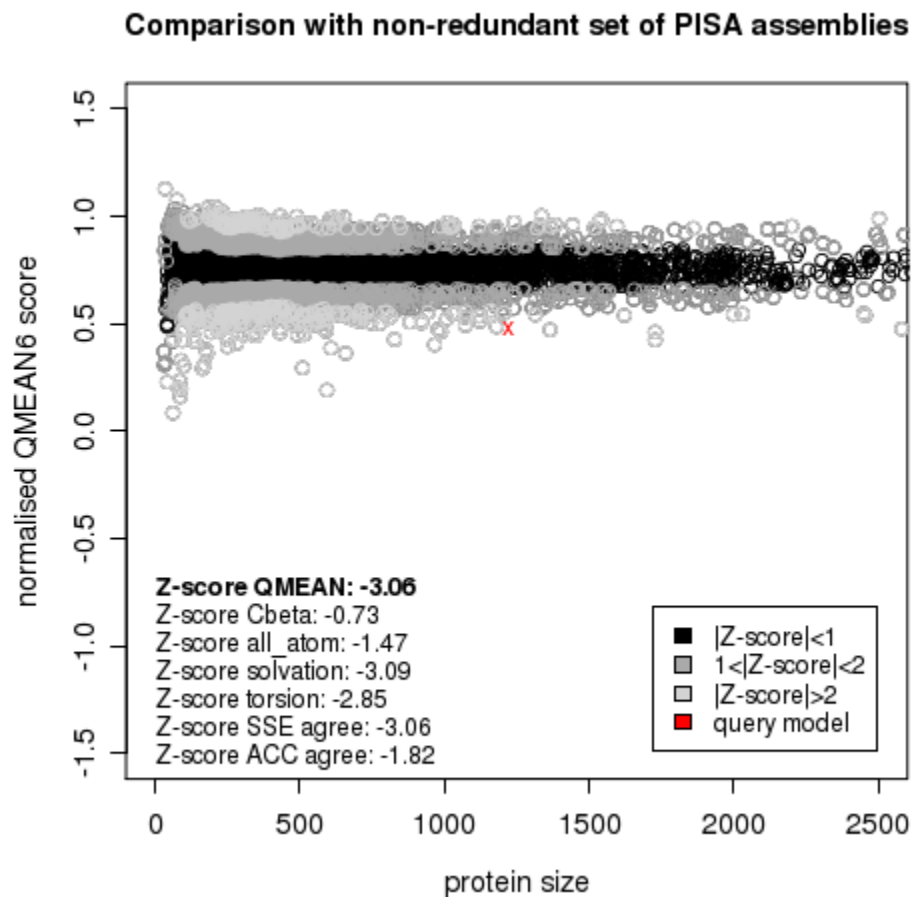
Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	1016	87.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	124	10.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	18	1.5%
Residues in disallowed regions	4	0.3%
Number of non-glycine and non-proline residues	1162	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	91	
Number of proline residues	69	
Total number of residues	1326	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 40\_3. Gráfica de Ramachandran del conformero inicial del sistema silvestre.

Confórmero en el equilibrio del sistema silvestre:



**Figura 41.** Valores de QMEAN del confórmero en el equilibrio del sistema silvestre.

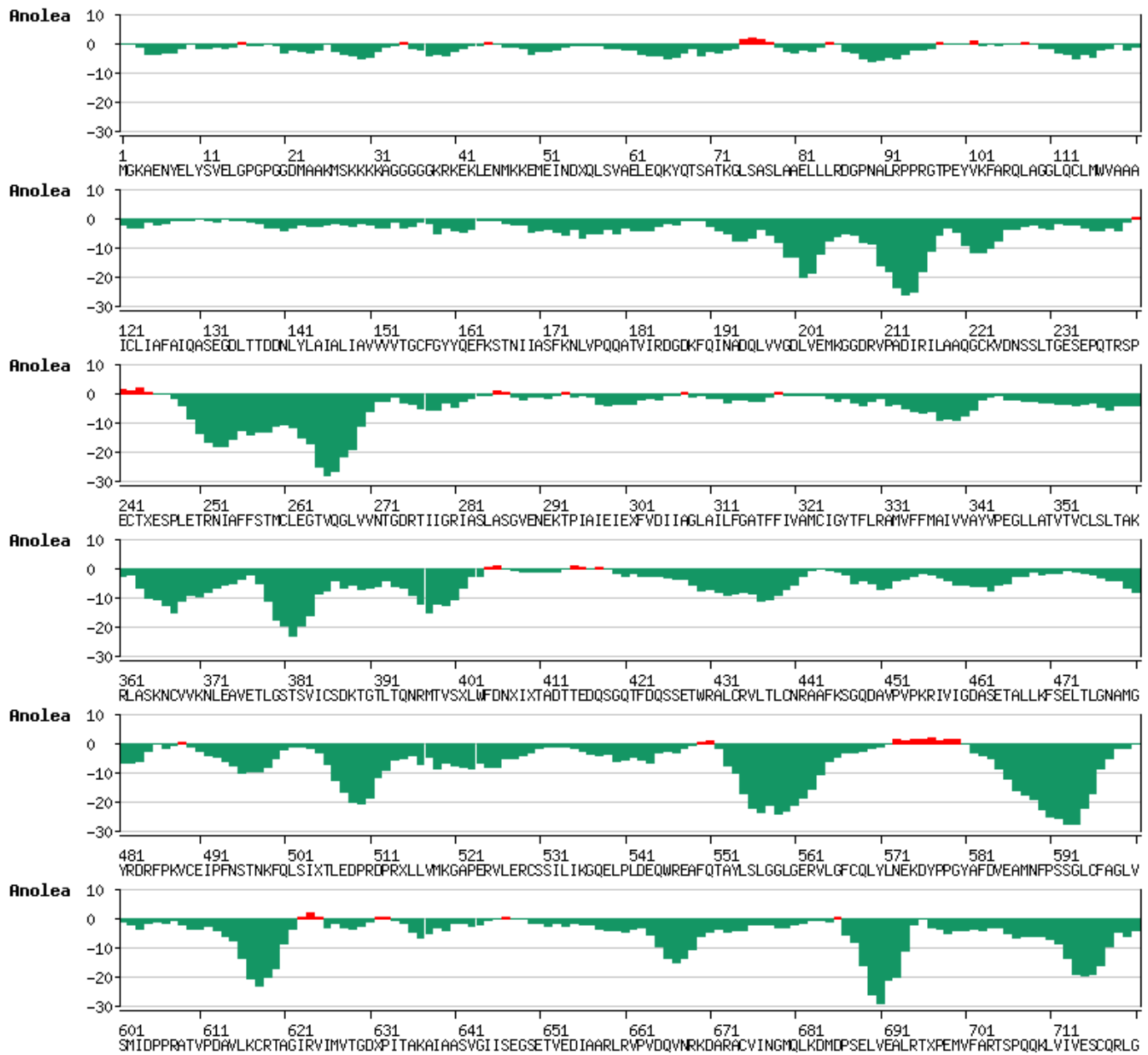
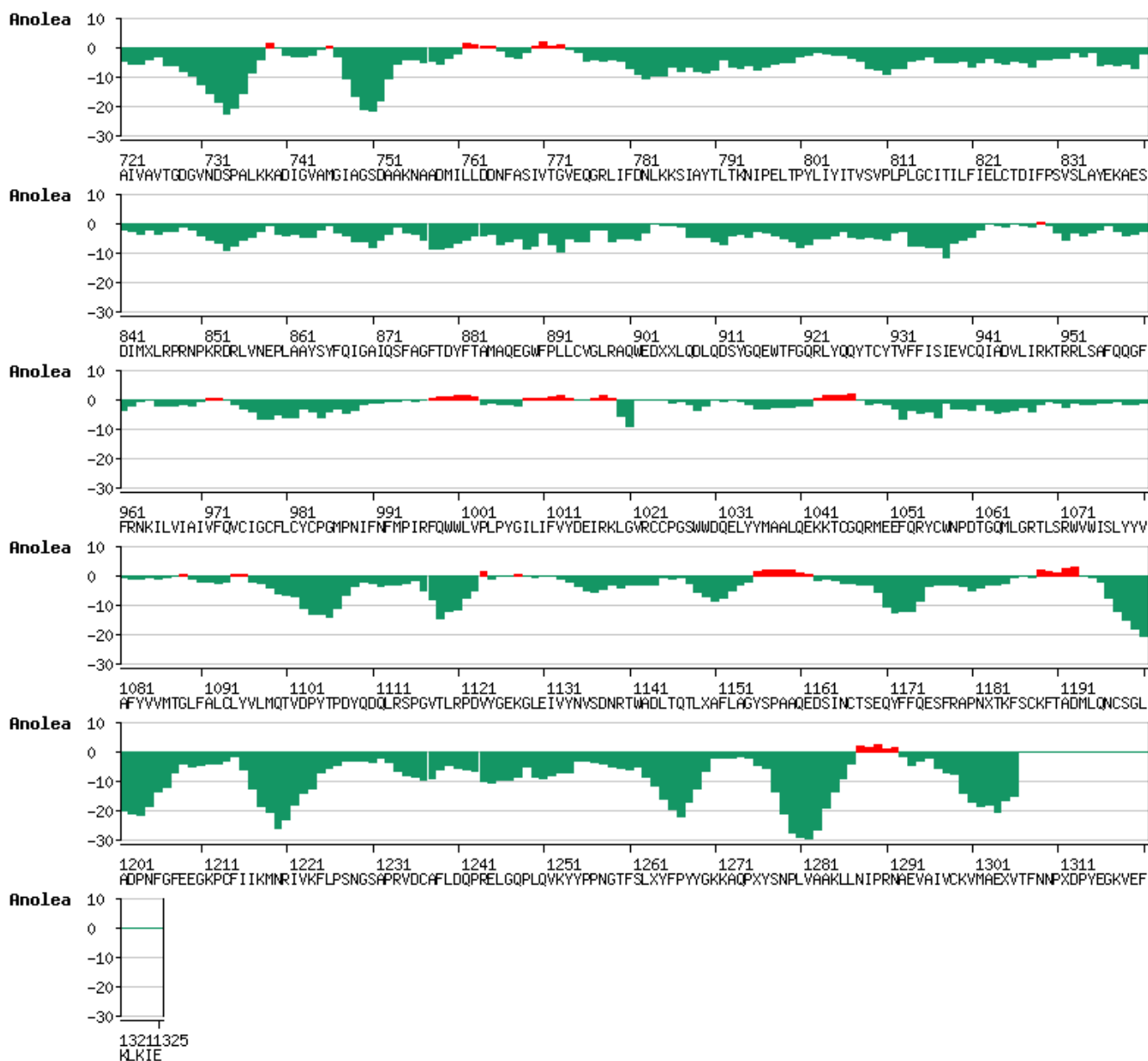


Figura 42\_1. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio del sistema silvestre.

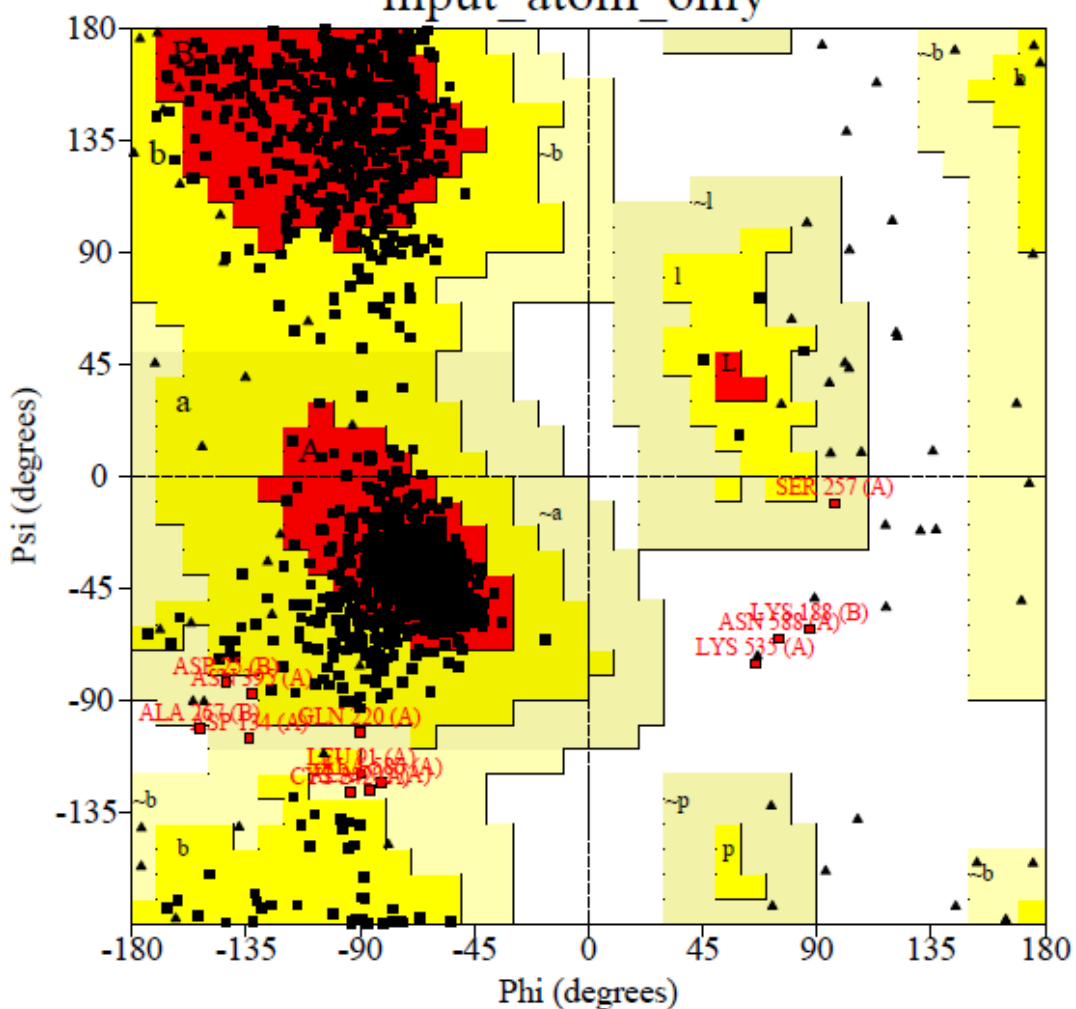
Confórmero en el equilibrio del sistema silvestre (continuación):



**Figura 42\_2.** Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio del sistema silvestre (continuación).

# Ramachandran Plot

input\_atom\_only



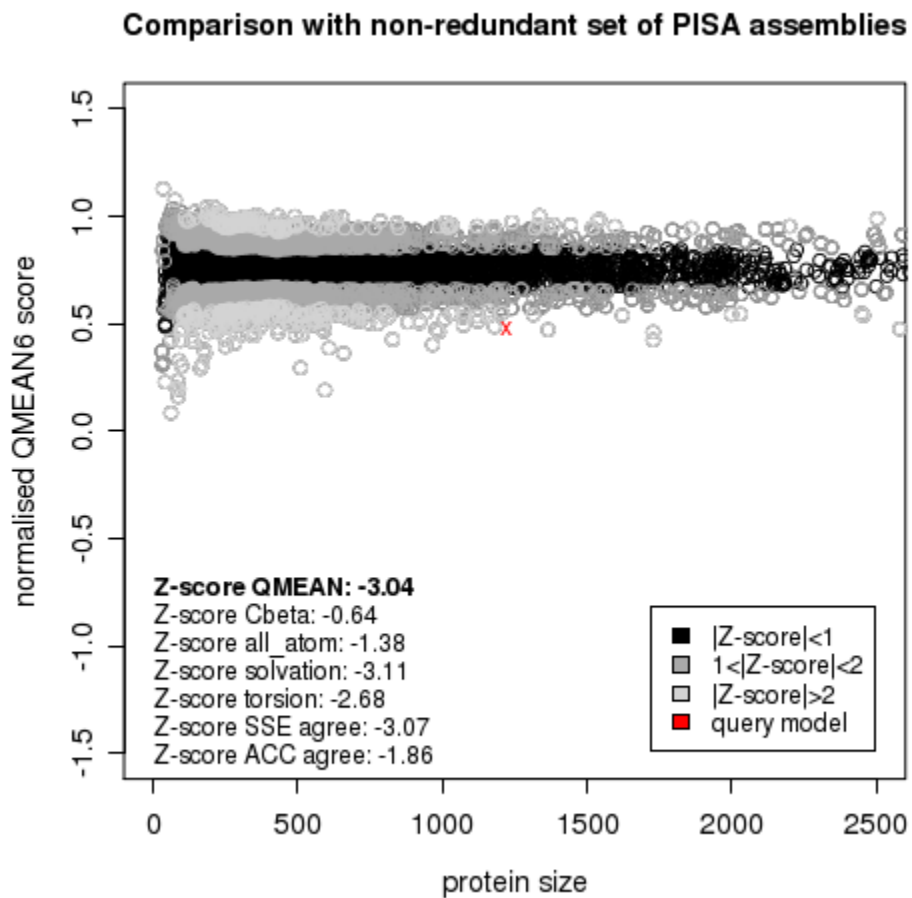
Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	946	81.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	203	17.5%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	9	0.8%
Residues in disallowed regions	4	0.3%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	1162	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	91	
Number of proline residues	69	
-----		
Total number of residues	1326	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 42\_3. Gráfica de Ramachandran del conformero en el equilibrio del sistema silvestre.

Confórmero minimizado del sistema silvestre:



**Figura 43.** Valores de QMEAN del confórmero minimizado del sistema silvestre.

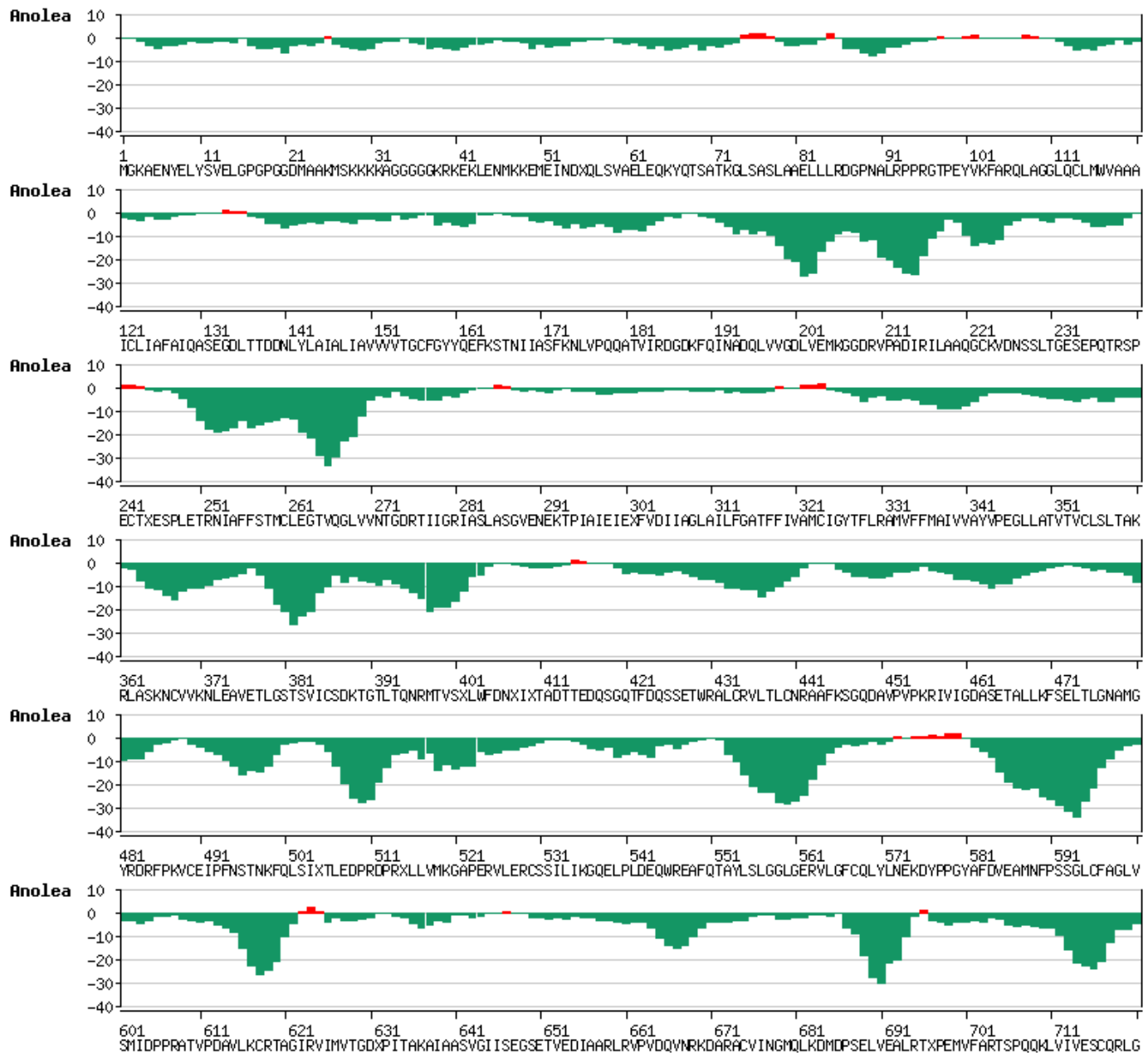


Figura 44\_1. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio minimizado del sistema silvestre.



Confórmero minimizado del sistema silvestre (continuación):

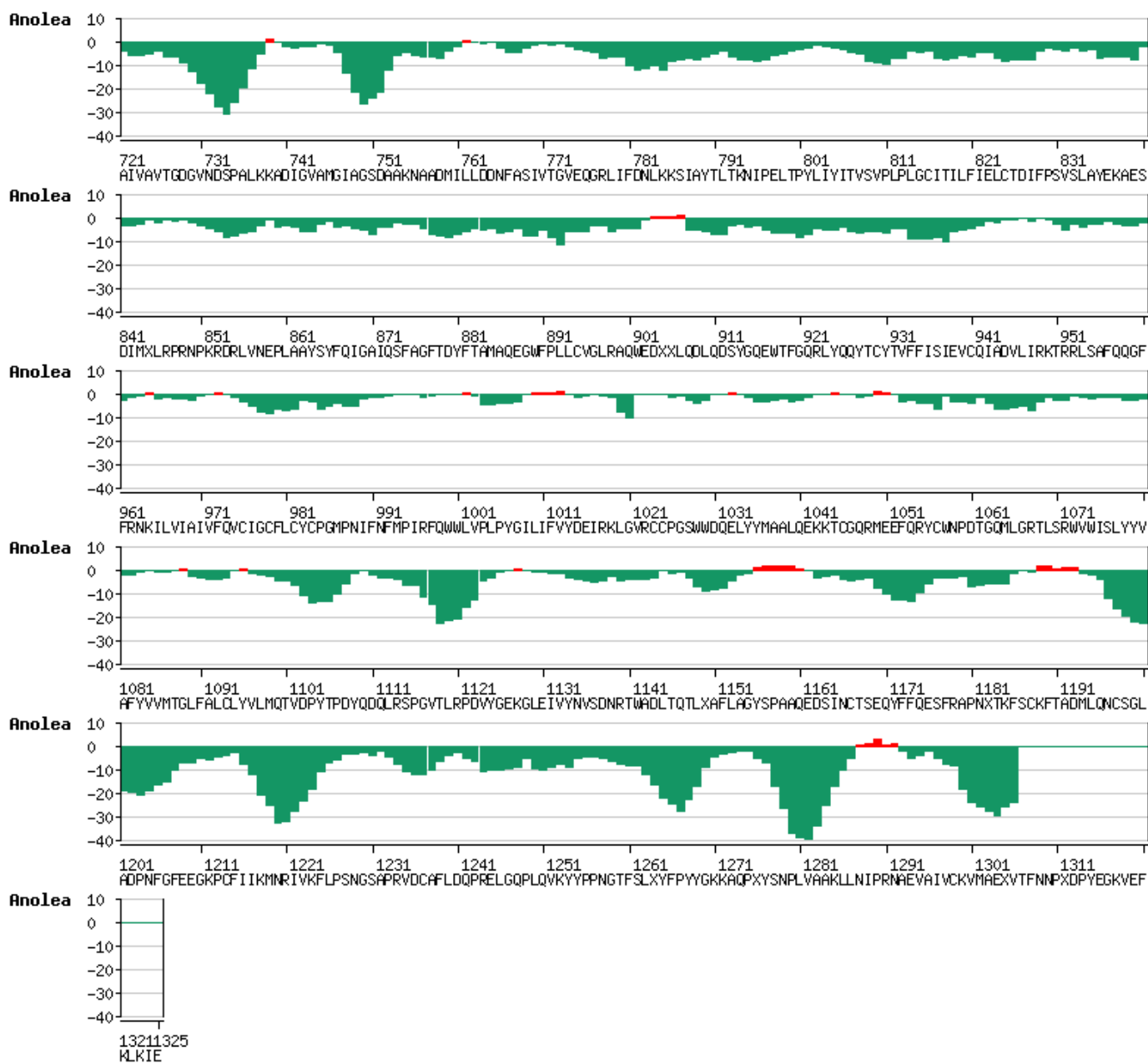
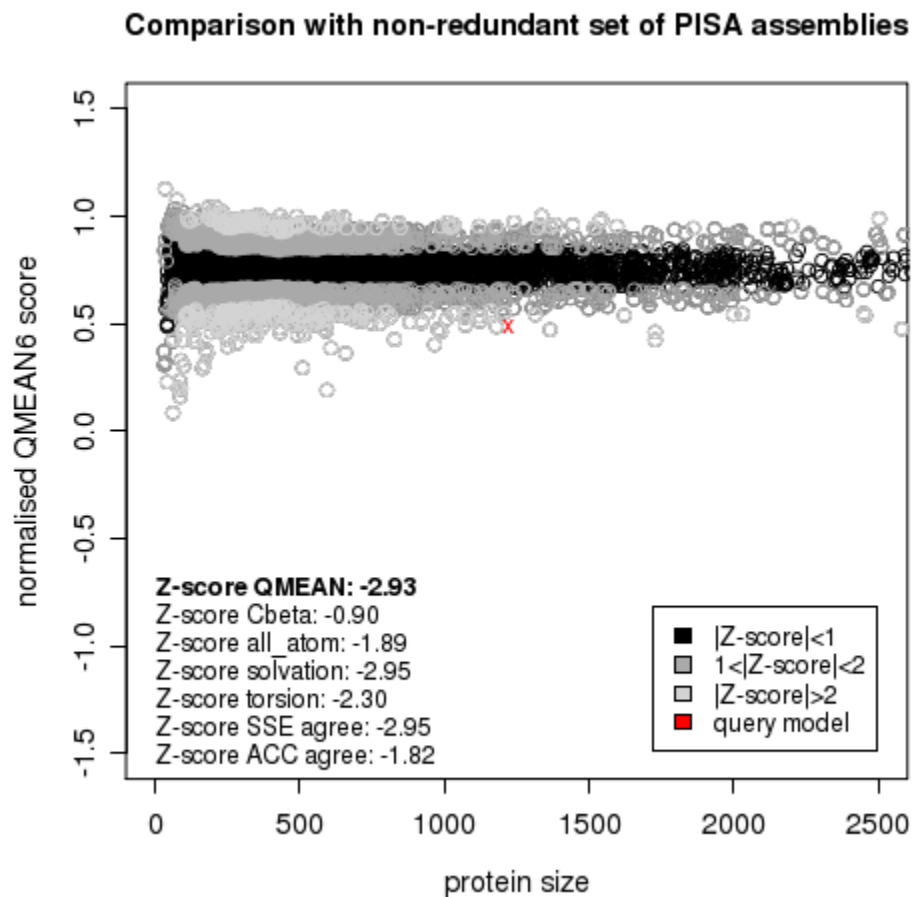


Figura 44\_2. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio minimizado del sistema silvestre.

Confórmero inicial del sistema 815:



**Figura 45.** Valores de QMEAN del confórmero inicial del sistema 815.

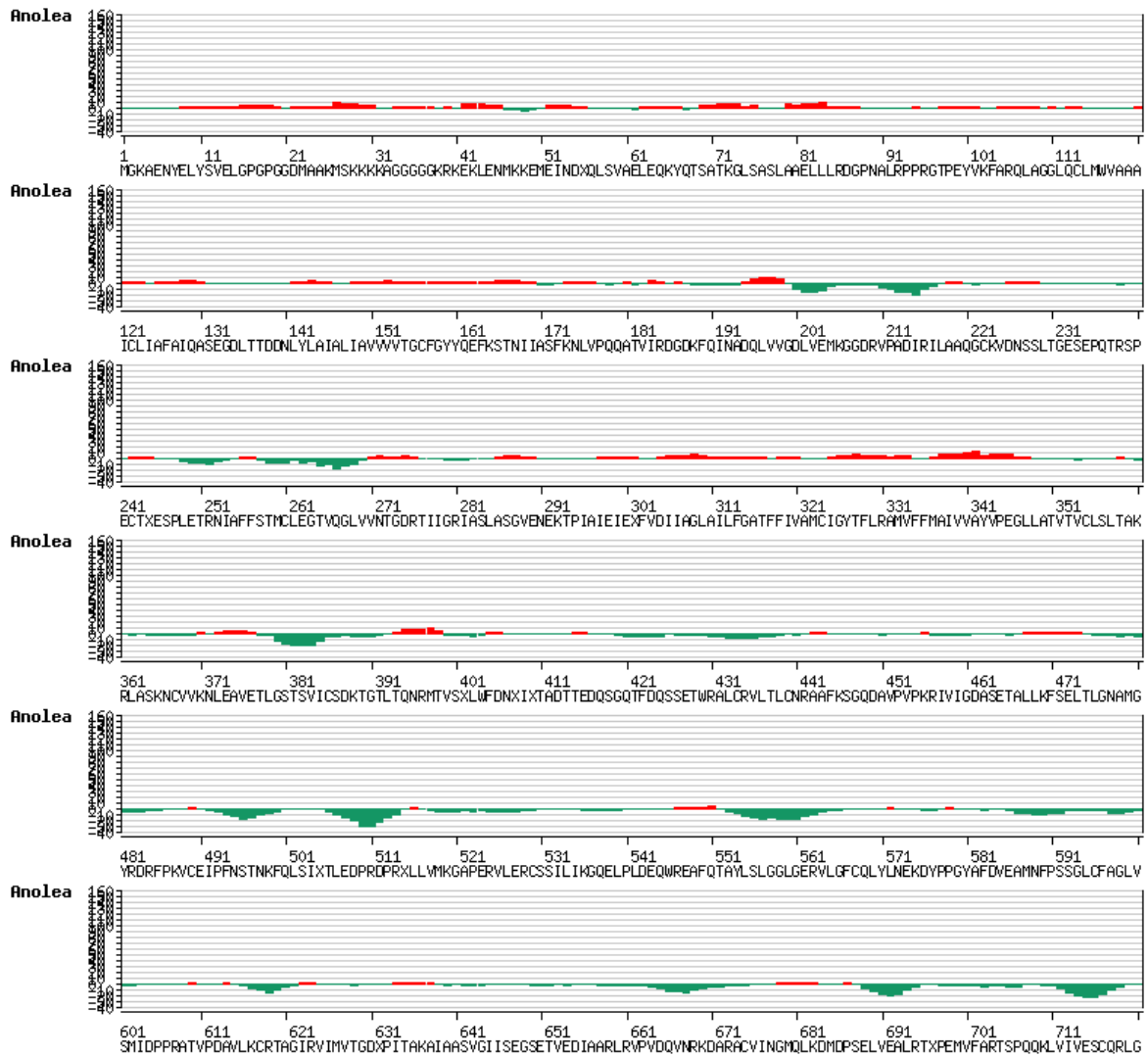


Figura 46\_1. Gráfica de ANOLEA del estado inicial del sistema 815.

Confórmero inicial del sistema 815 (continuación):

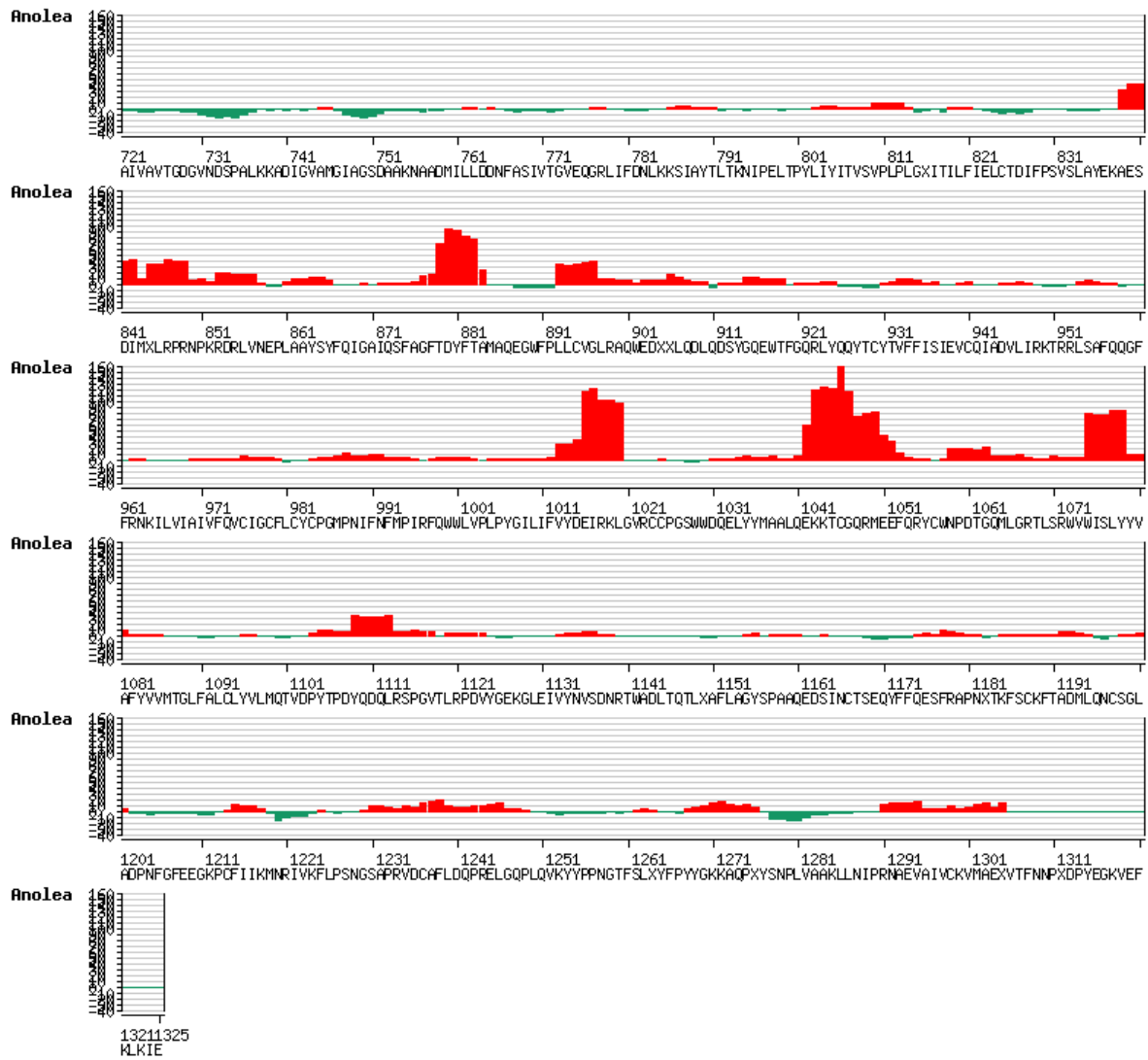


Figura 46\_2. Gráfica de ANOLEA del estado inicial del sistema 815.

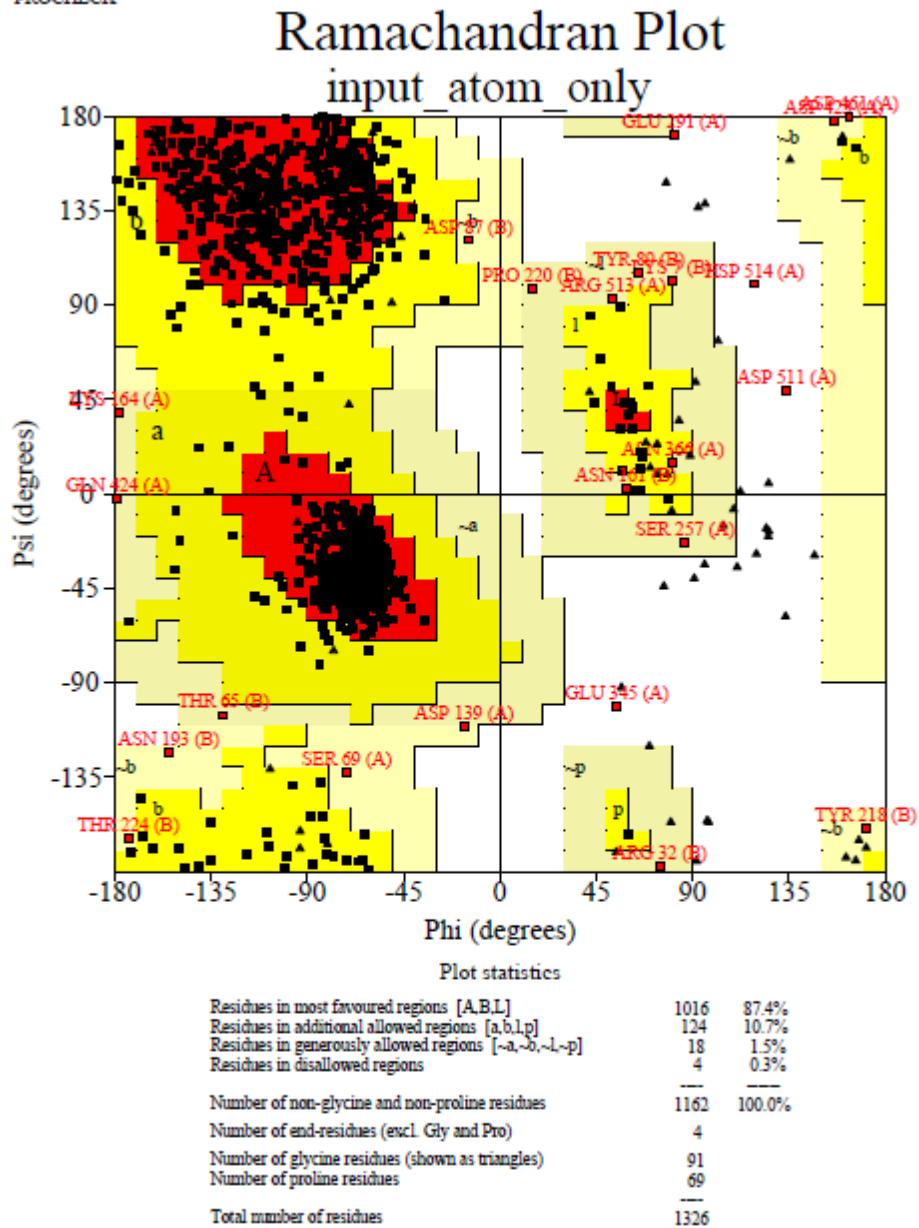
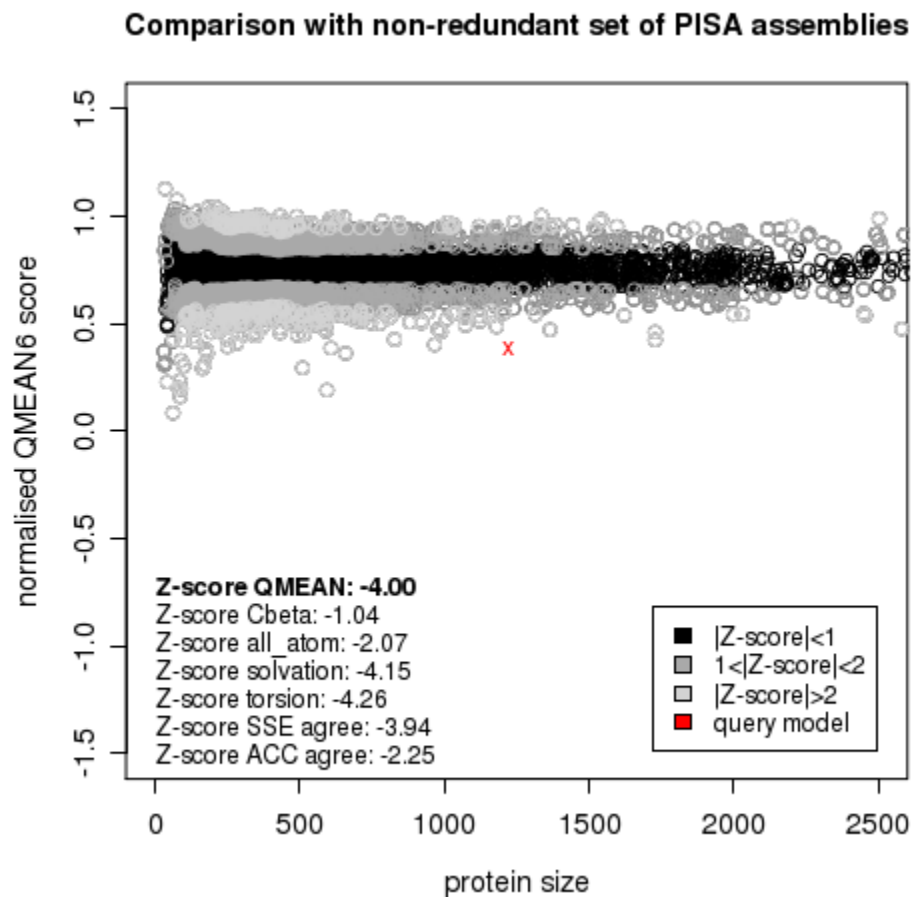


Figura 46\_3. Gráfica de Ramachandran del conformero inicial del sistema 815.

Confórmero en el equilibrio del sistema 815:



**Figura 47.** Valores de QMEAN del confórmero en el equilibrio del sistema 815.

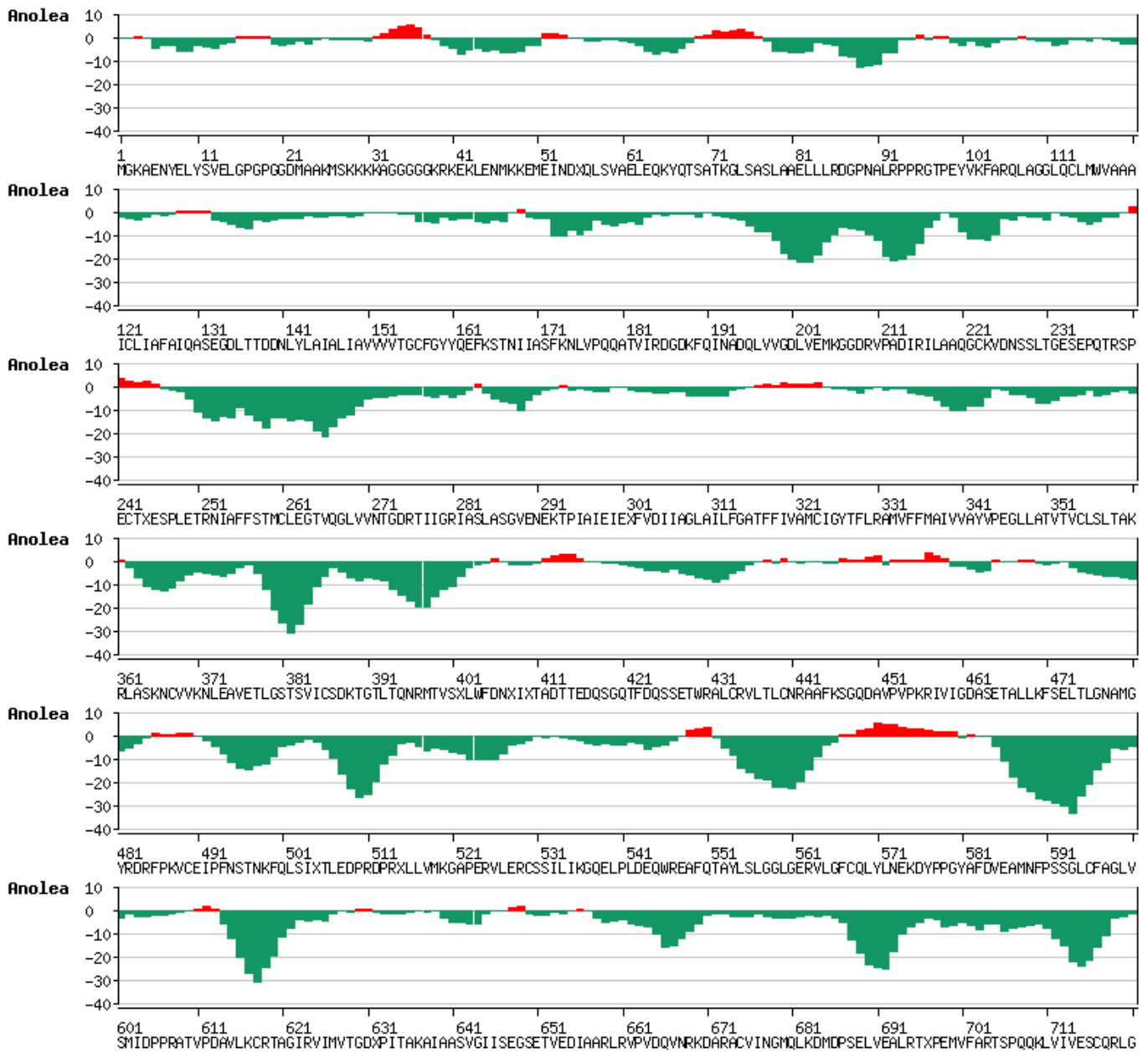
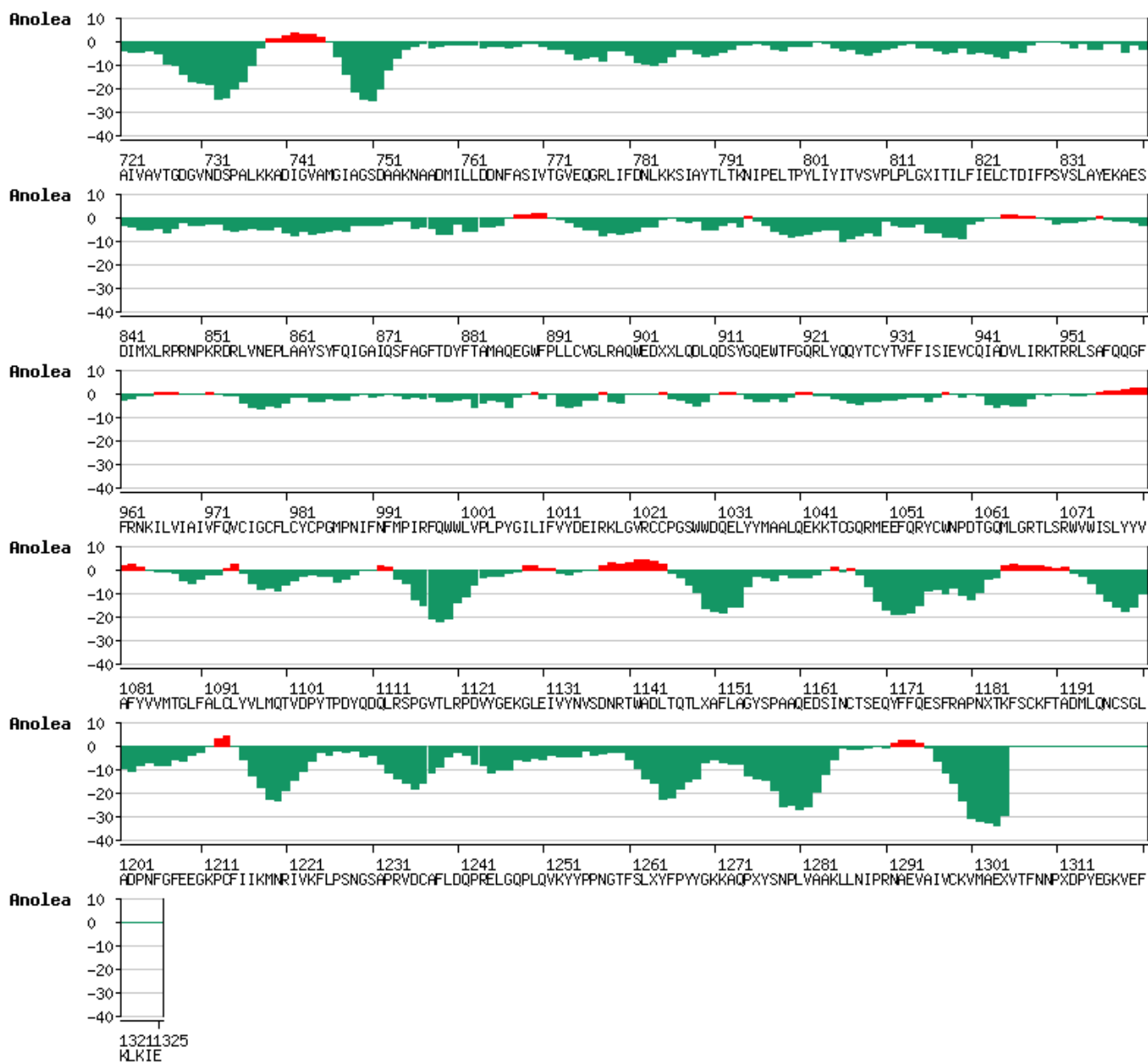


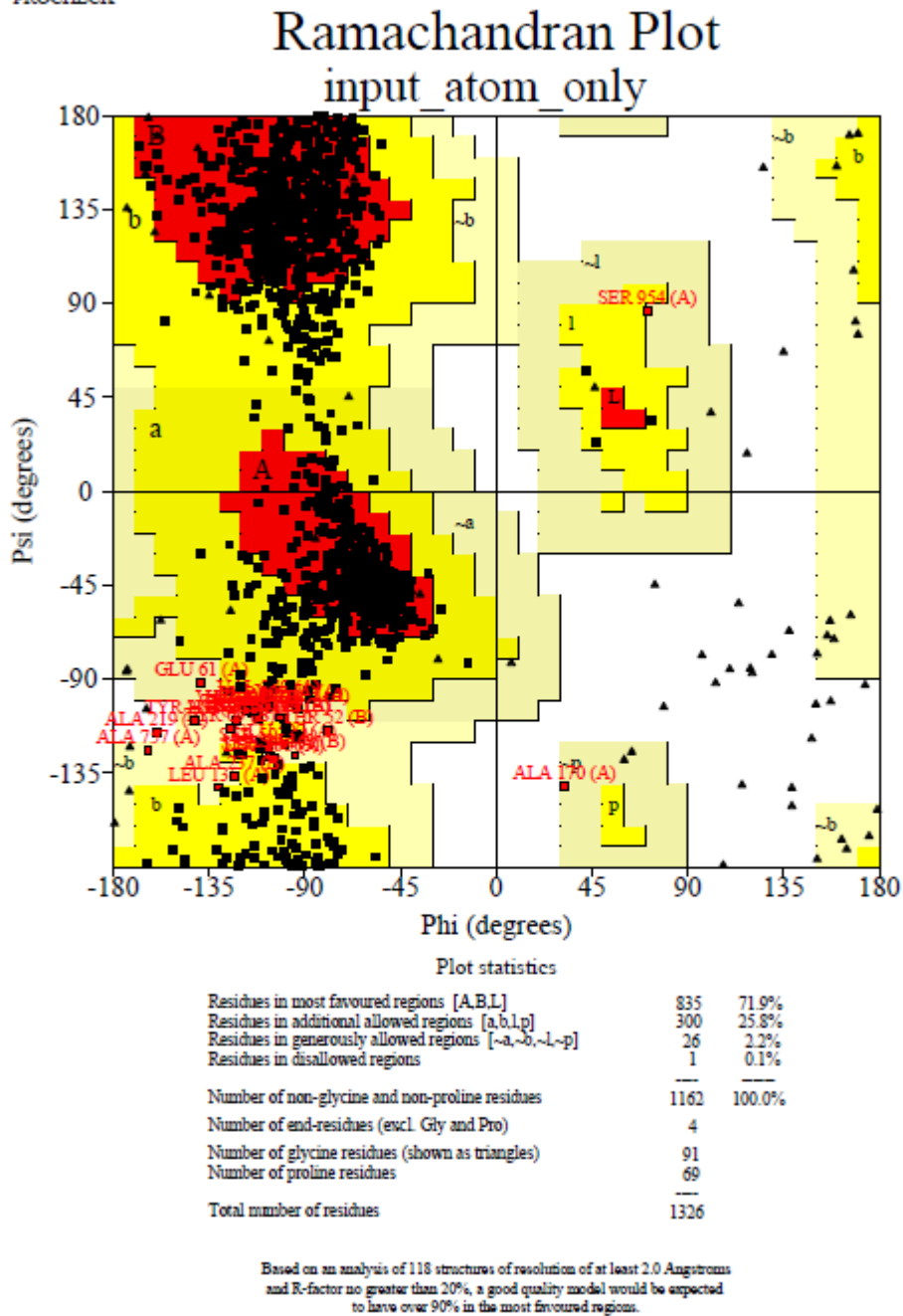
Figura 48\_1. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio del sistema 815.

Confórmero en el equilibrio del sistema 815 (continuación):



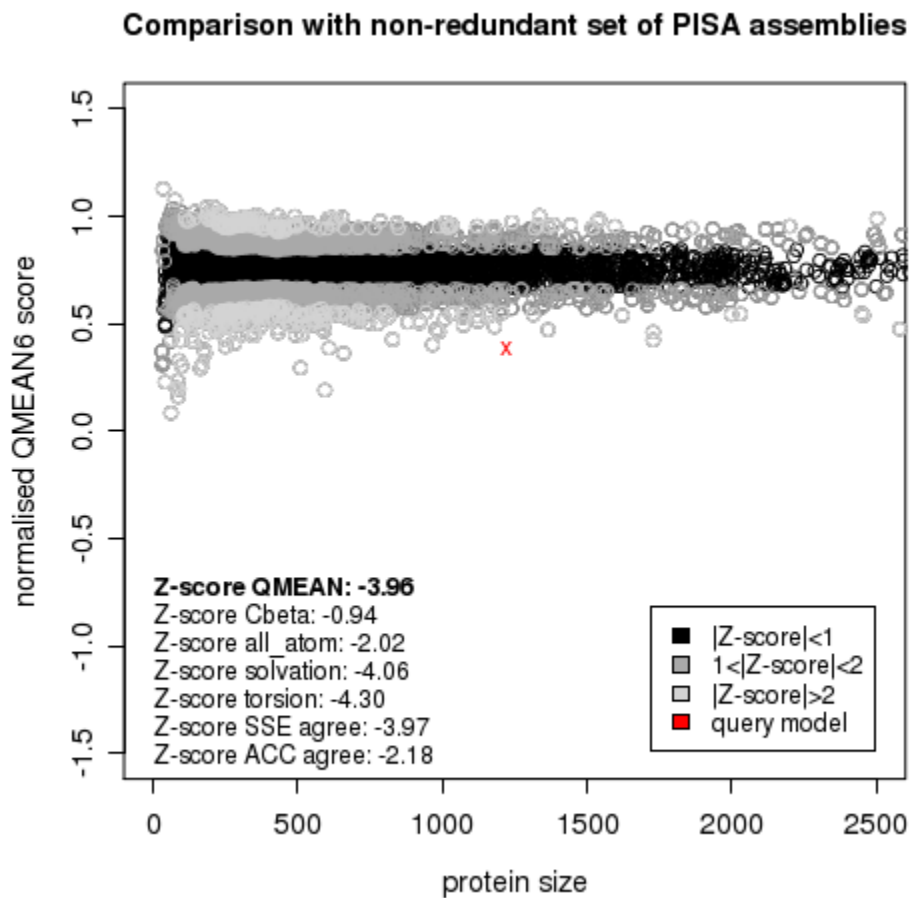
**Figura 48\_2.** Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio del sistema 815 (continuación).





**Figura 48\_3.** Gráfica de Ramachandran del conformero en el equilibrio del sistema 815.

Confórmero minimizado del sistema 815:



**Figura 49.** Valores de QMEAN del confórmero minimizado del sistema 815.

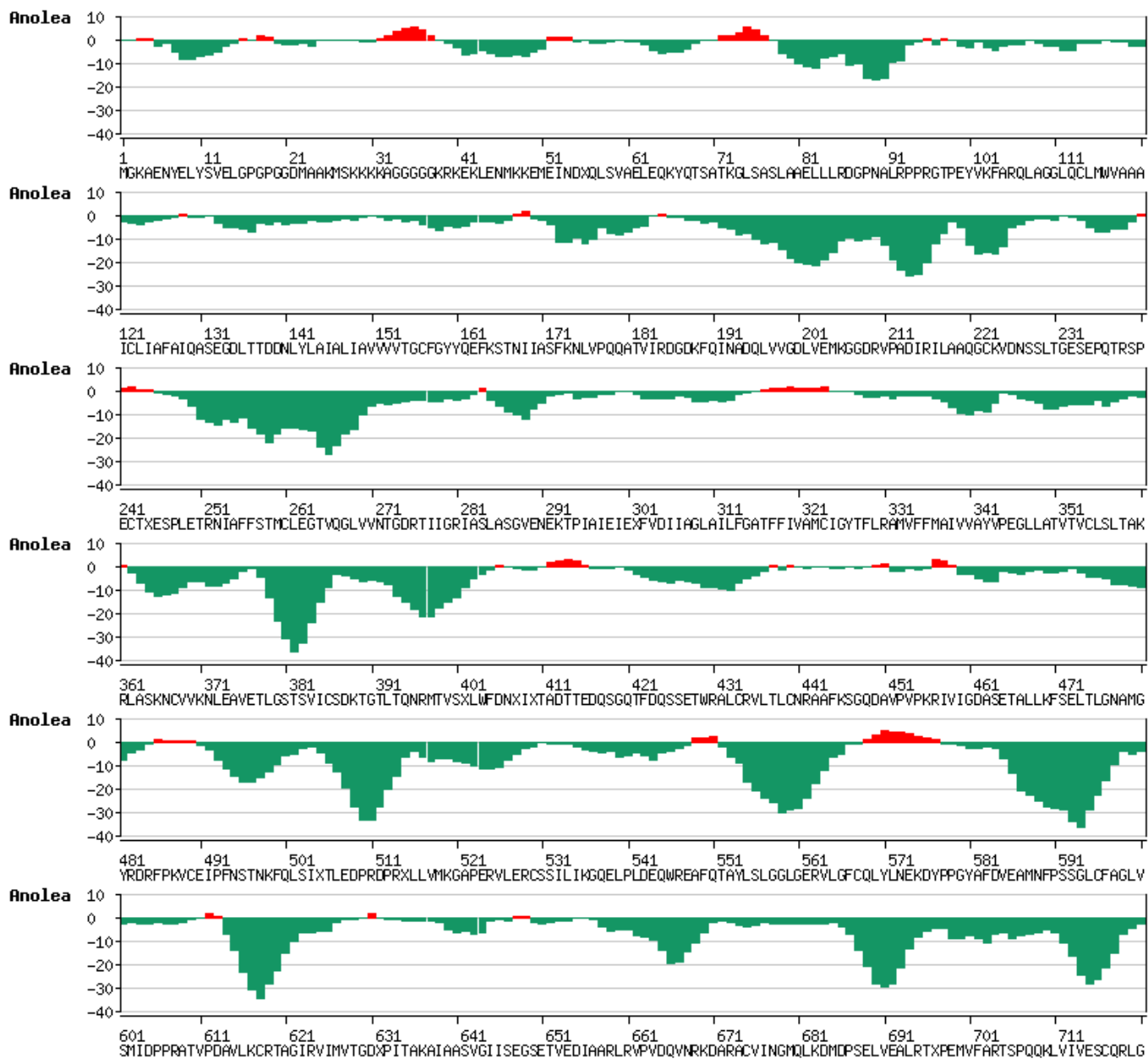


Figura 50\_1. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio minimizado del sistema 815.

Confórmero minimizado del sistema 815 (continuación):

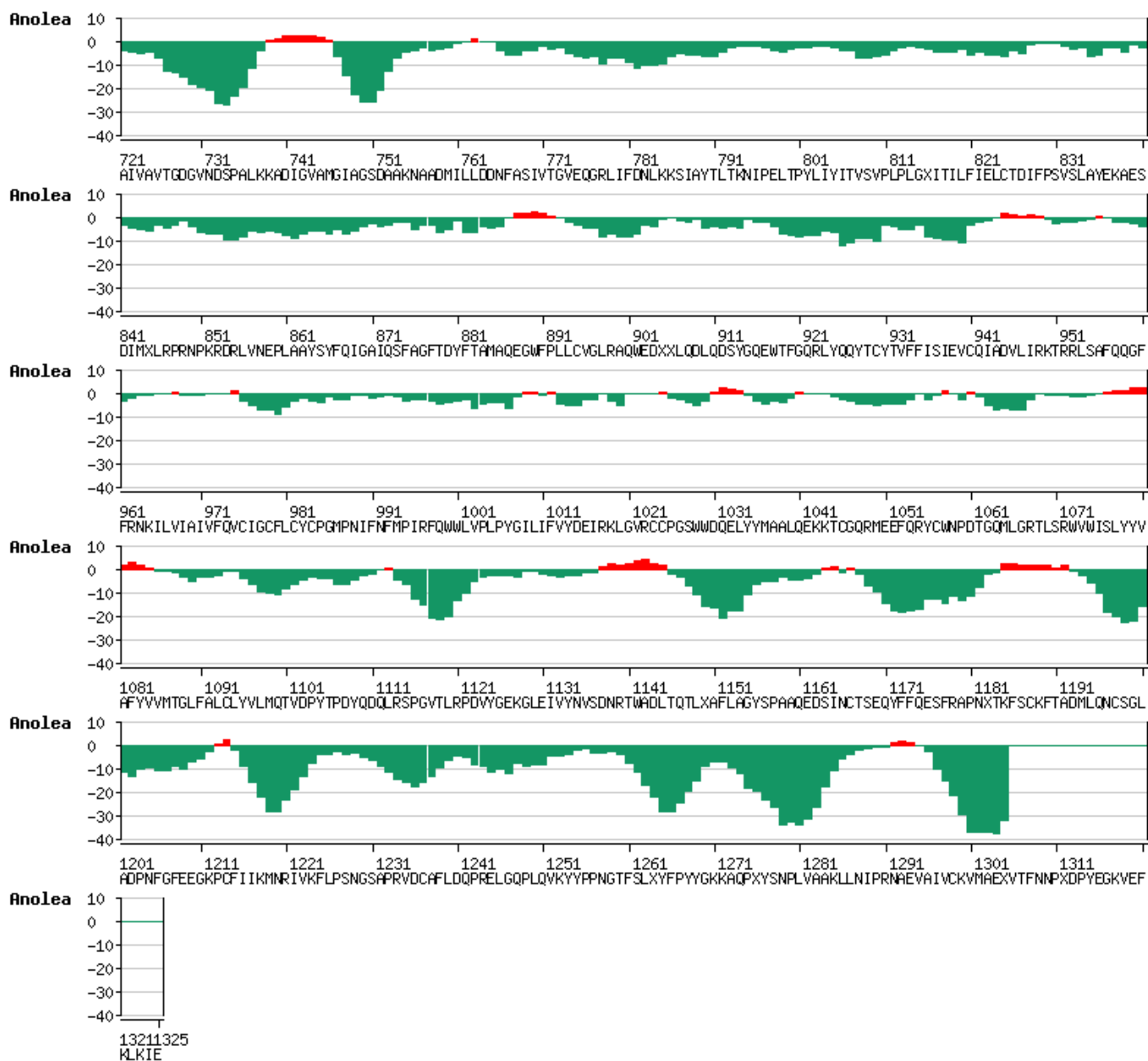
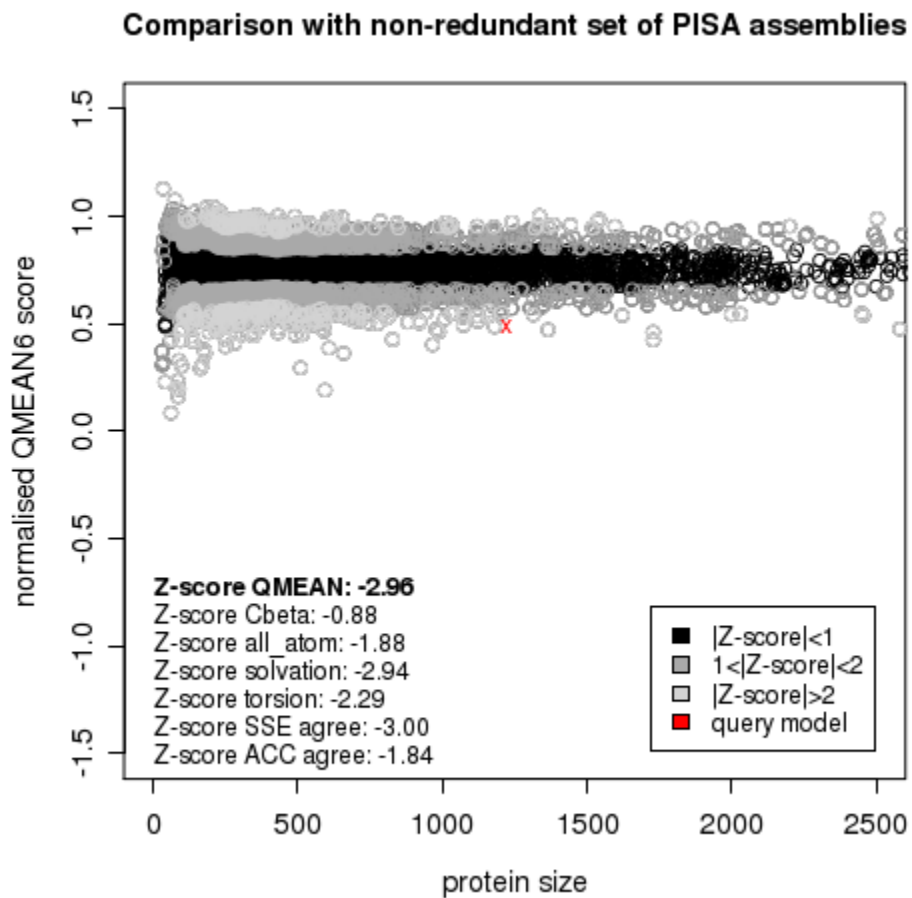


Figura 50\_2. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio minimizado del sistema 815 (continuación)

Confórmero inicial del sistema 824:



**Figura 51.** Valores de QMEAN del confórmero inicial del sistema 824.

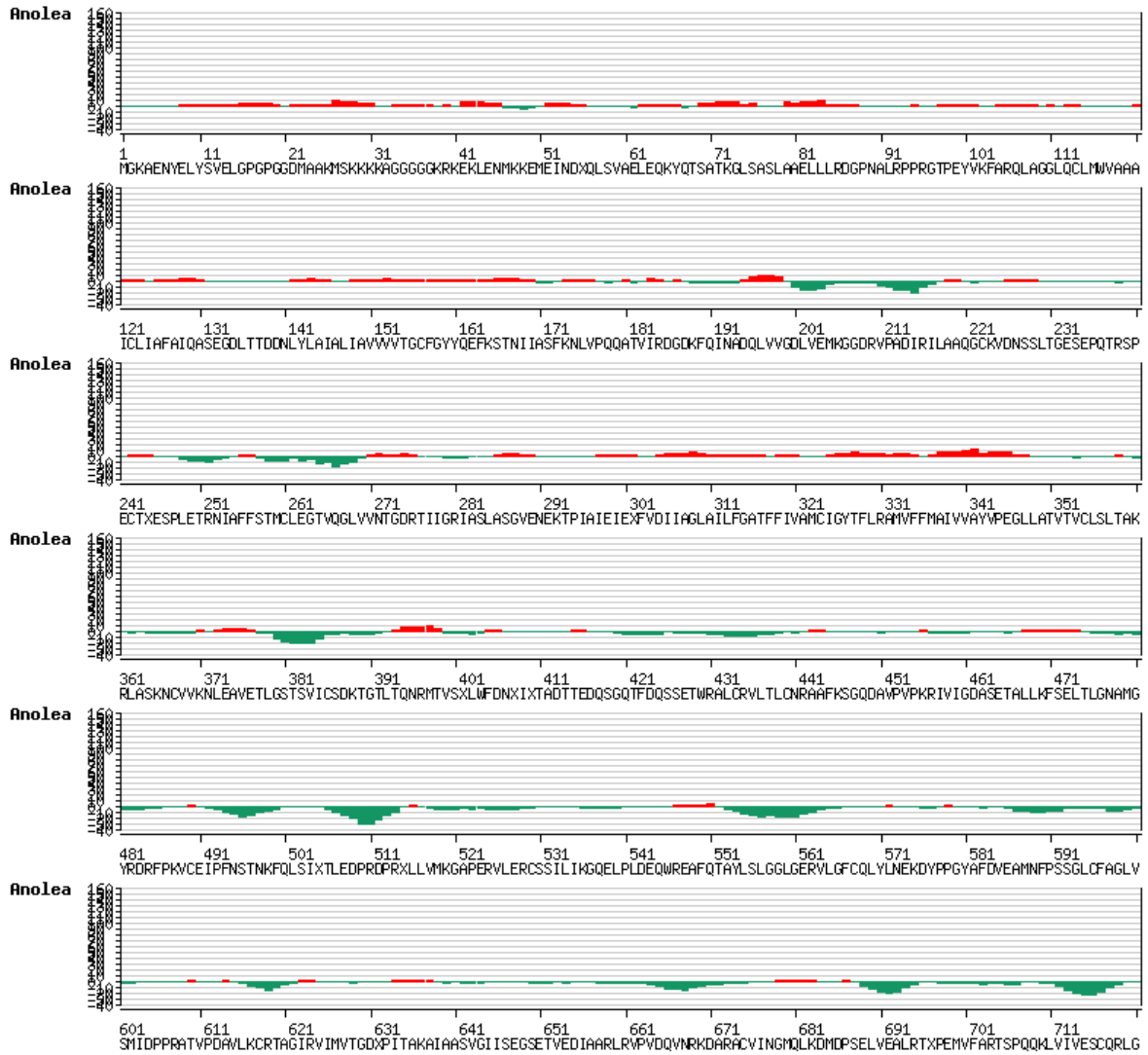


Figura 52\_1. Gráfica de ANOLEA del estado inicial del sistema 824.

Confórmero inicial del sistema 824 (continuación):

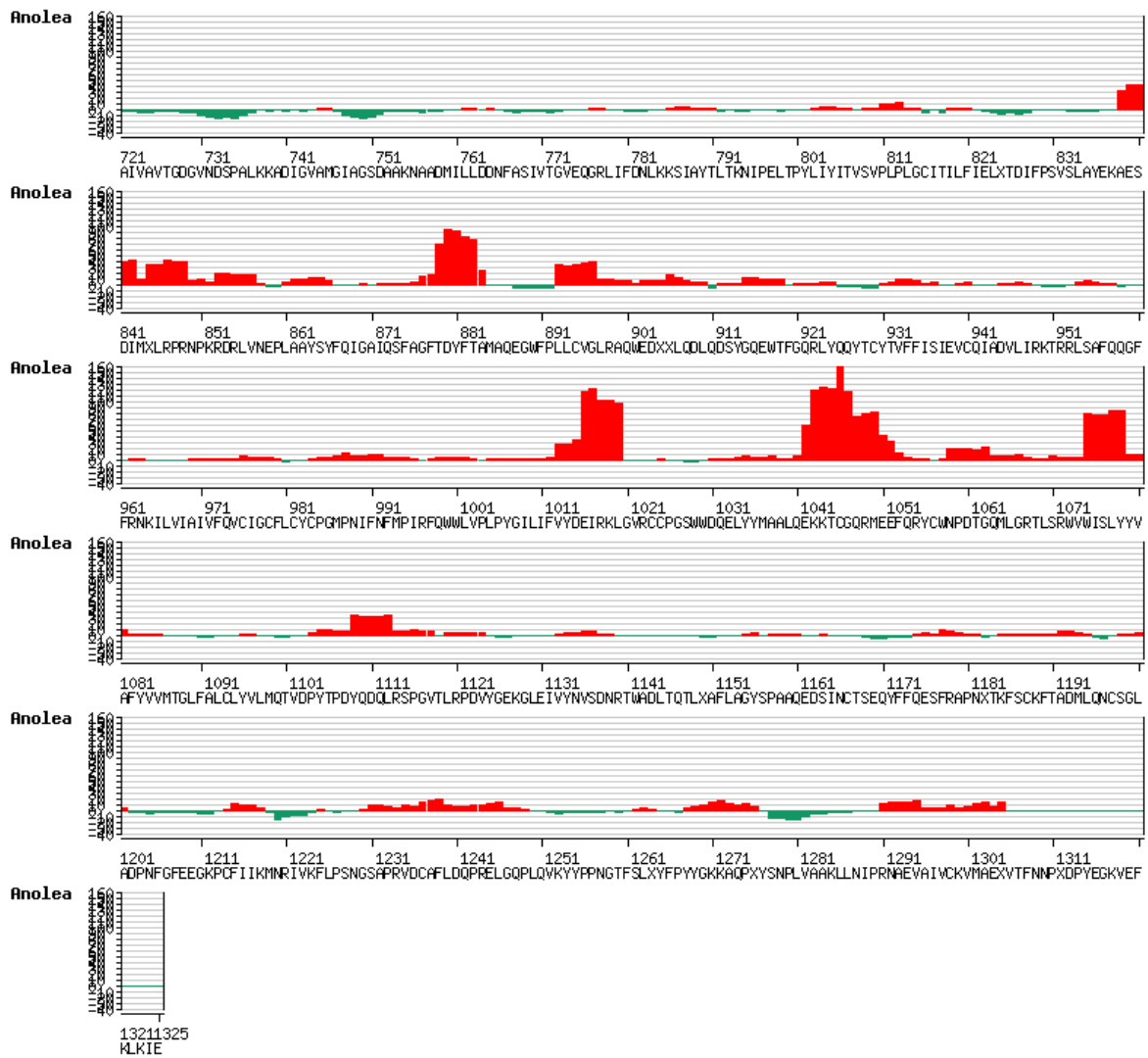
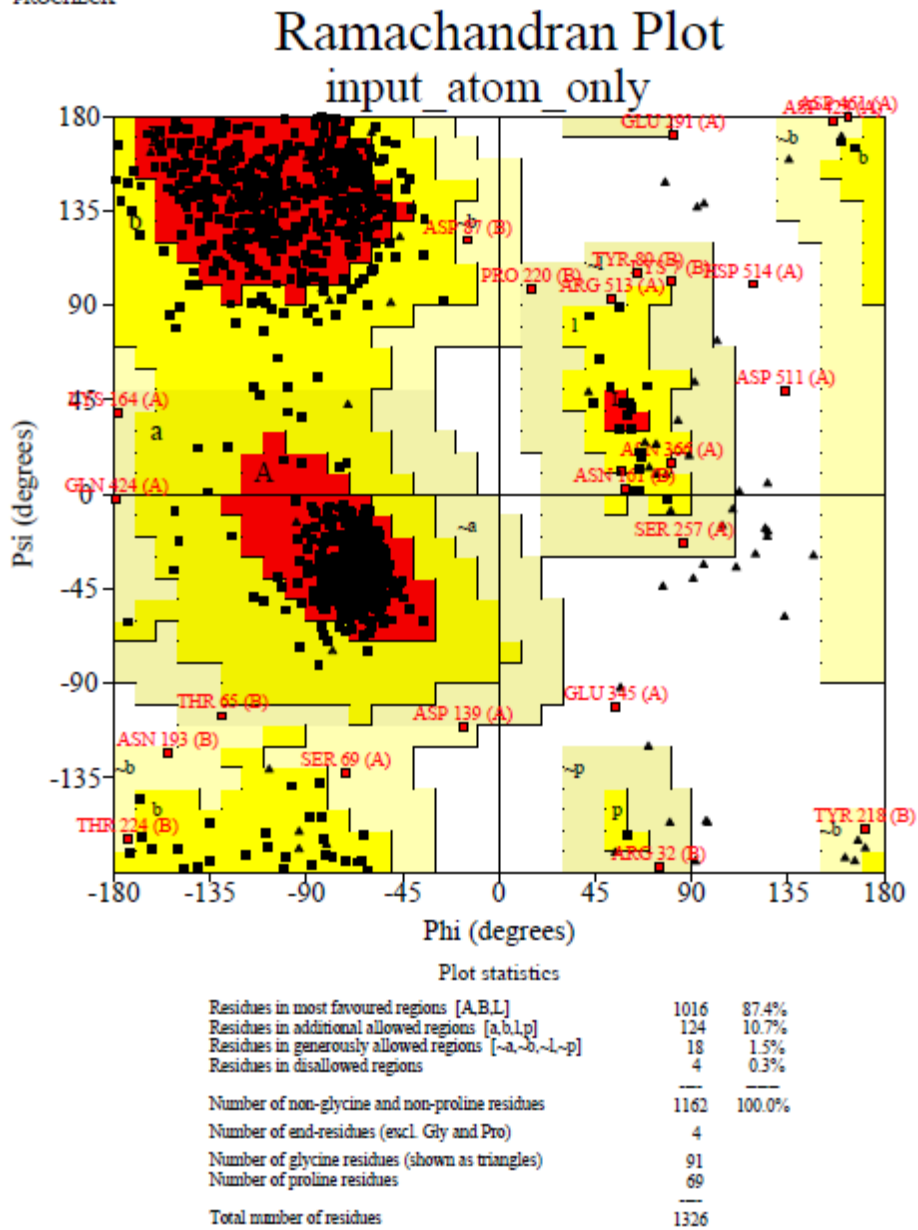


Figura 52\_2. Gráfica de ANOLEA del estado inicial del sistema 824 (continuación).

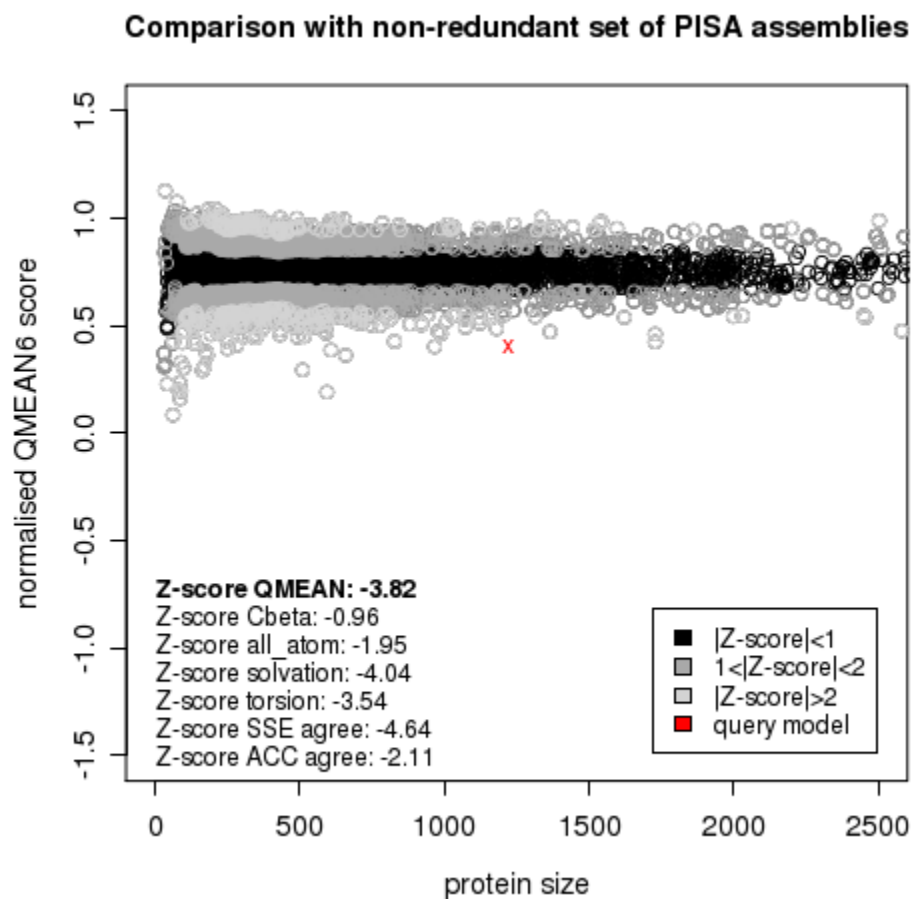


Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 52\_3. Gráfica de Ramachandran del conformero inicial del sistema 824.



Confórmero en el equilibrio del sistema 824:



**Figura 53.** Valores de QMEAN del confórmero en el equilibrio del sistema 824.

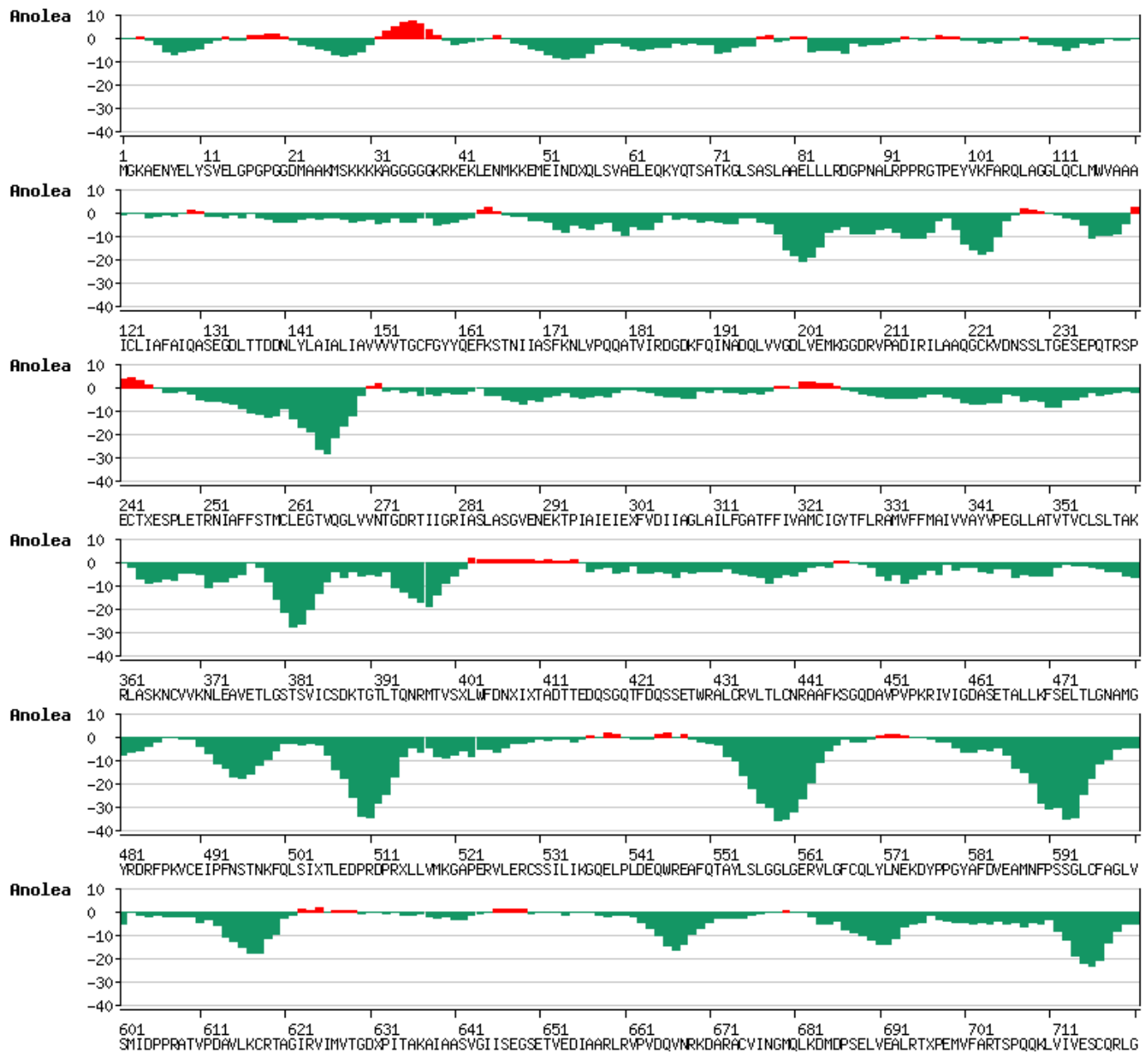


Figura 54\_1. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio del sistema 824.

Confórmero en el equilibrio del sistema 824 (continuación):

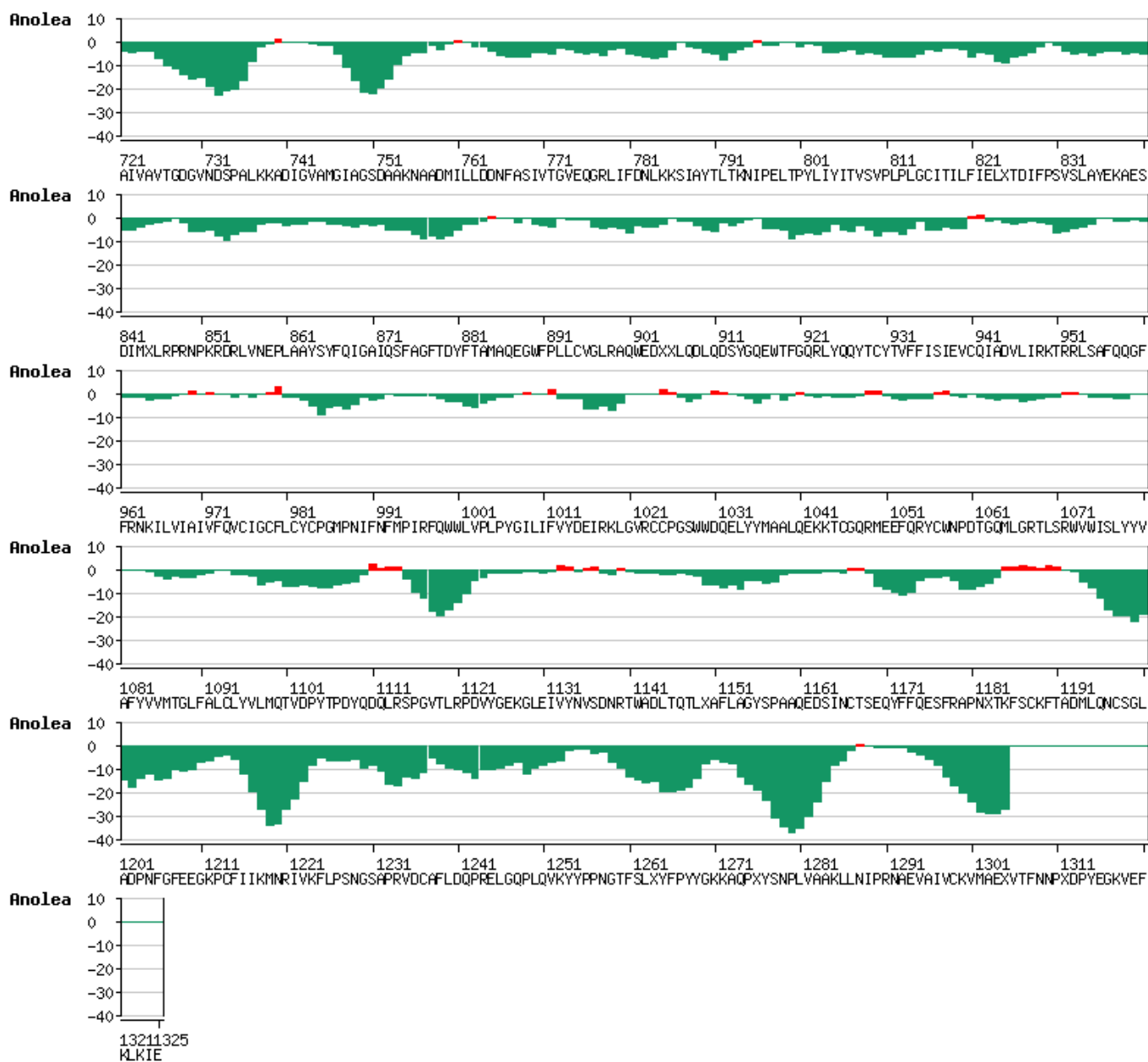
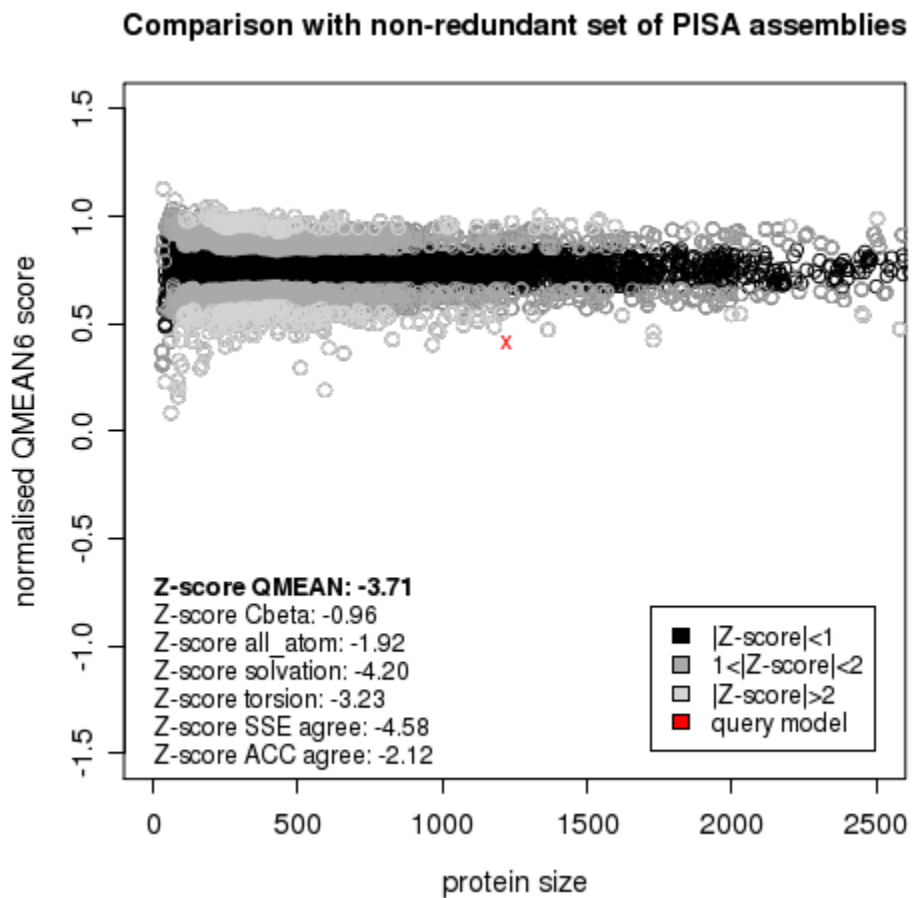


Figura 54\_2. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio del sistema 824 (continuación).



Confórmero minimizado del sistema 824:



**Figura 55.** Valores de QMEAN del confórmero minimizado del sistema 824.

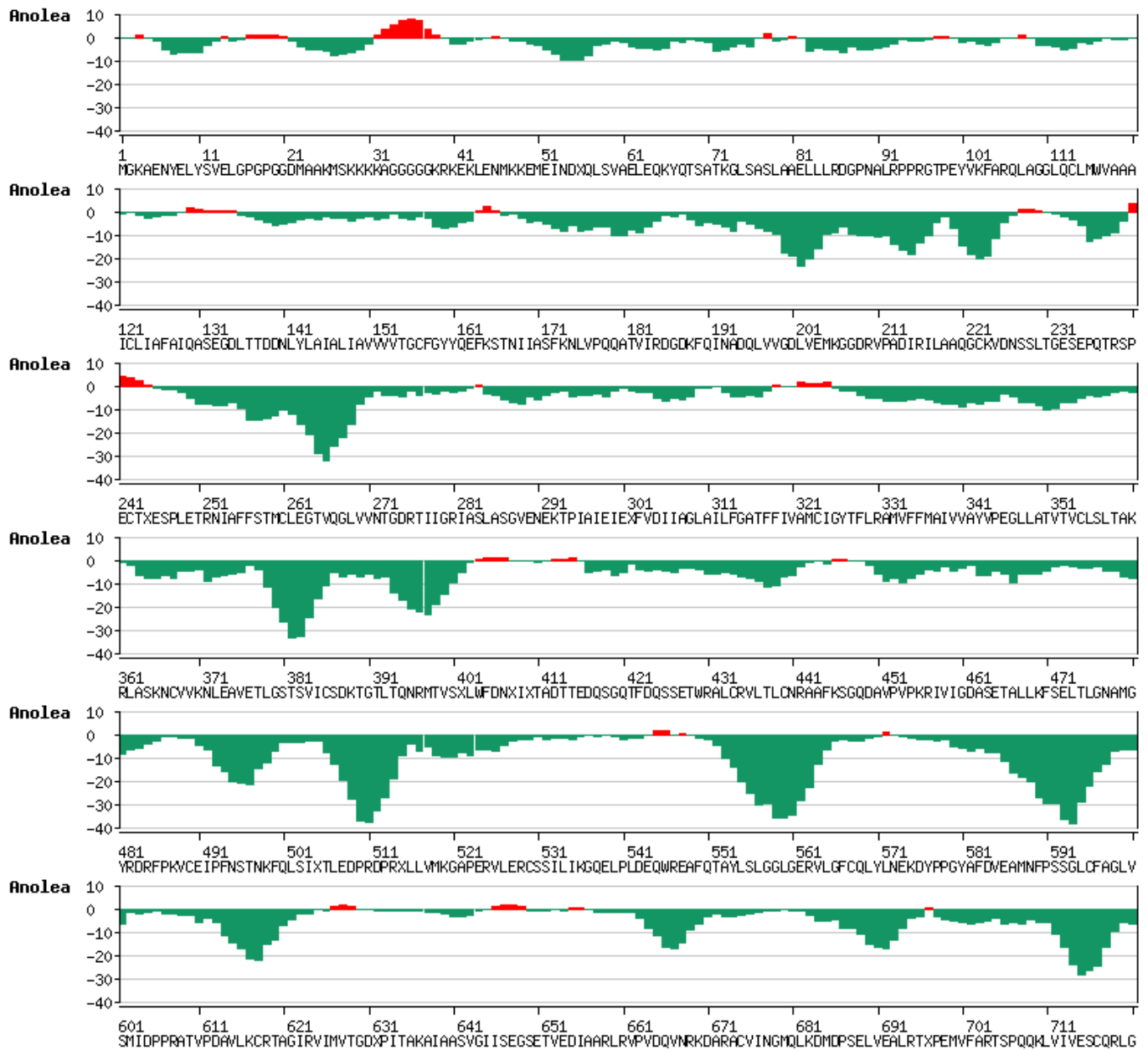


Figura 56\_1. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio minimizado del sistema 824.

Confórmero minimizado del sistema 824 (continuación):

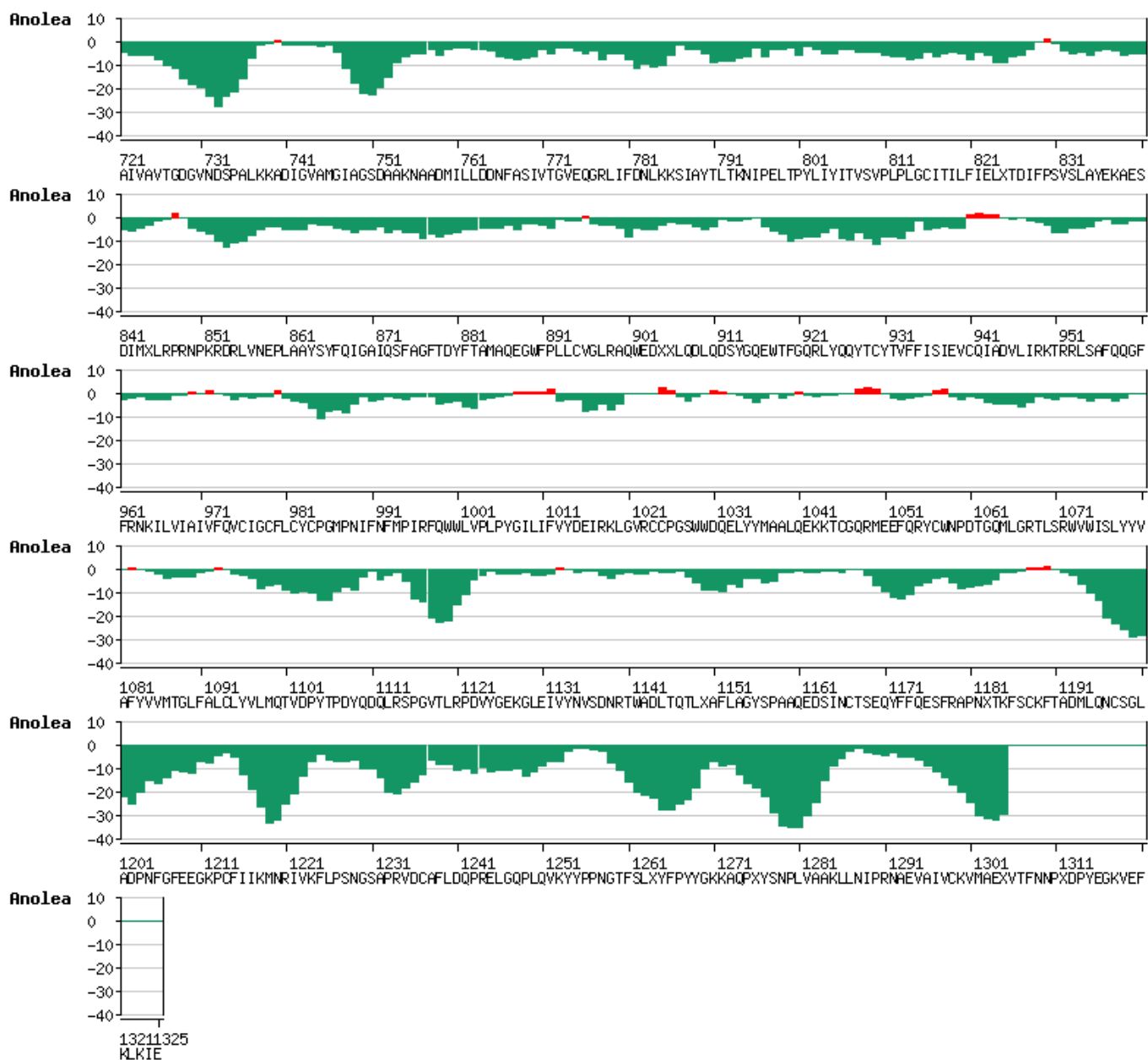
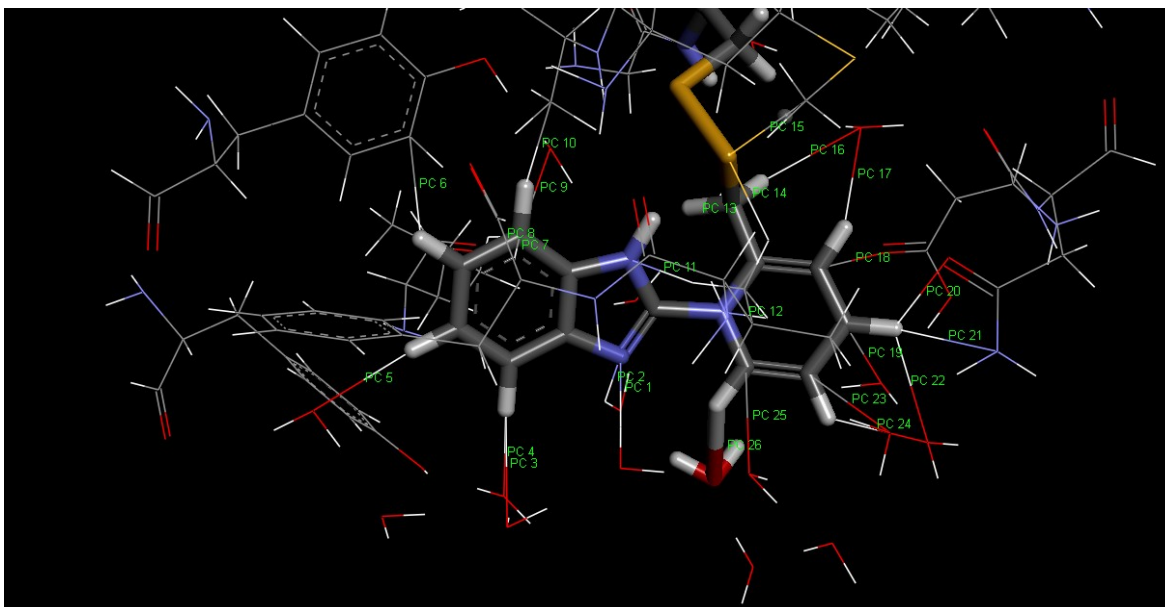


Figura 56\_2. Gráfica de ANOLEA del estado en el equilibrio minimizado del sistema 824 (continuación).

## Anexo 5. Tablas y figuras de los puntos críticos de enlace.

Confórmero inicial minimizado del sistema 815:



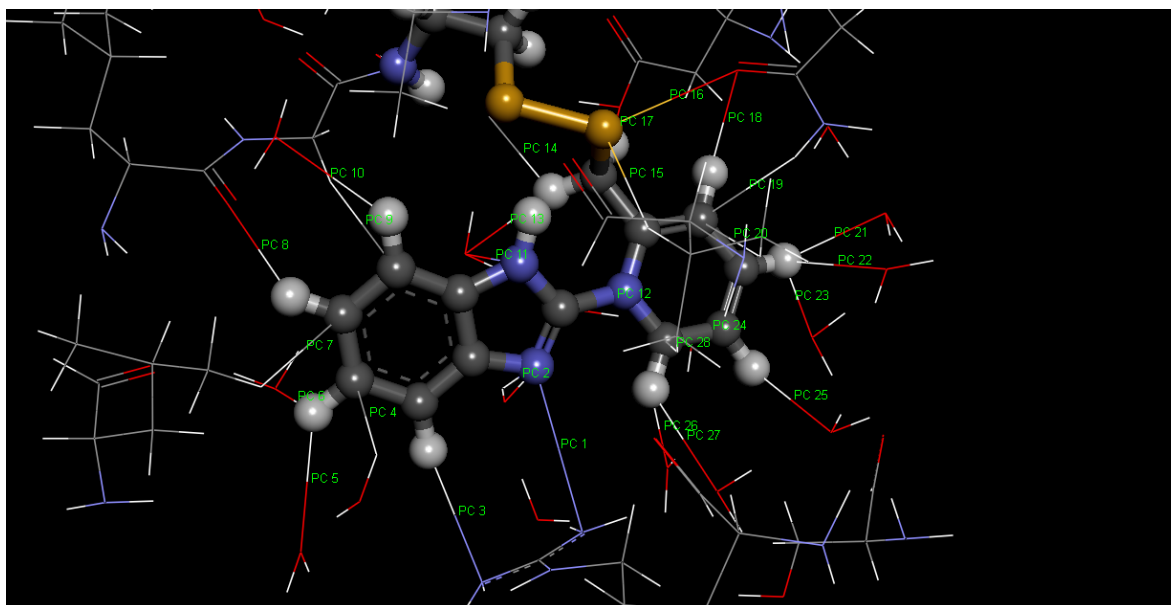
**Figura 57.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 815 con átomos de moléculas cercanas en el confórmero inicial minimizado.



**Tabla 29.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 815 con átomos de moléculas cercanas en el conformero inicial minimizado.

Inicial		BCP	Name	Atoms	Rho	desSqRho	Ellip	K	BPL-GL
TIP9093 H	PC 1	291	BCP291	N214 - H324	0.018775	0.05751	0.072896	-0.000313	0.017203
TIP4231 H	PC 2	422	BCP422	N214 - H315	0.019943	0.061862	0.016262	-0.000296	0.031471
TIP4565 O	PC 3	460	BCP460	H221 - O344	0.00504	0.018576	0.984745	-0.000913	0.035544
TIP8076 O	PC 4	453	BCP453	H221 - O338	0.009199	0.031665	0.108475	-0.000626	0.009192
TIP5423 O	PC 5	281	BCP281	H222 - O335	0.006517	0.024366	0.11536	-0.000801	0.012528
Tyr801 C	PC 6	279	BCP279	C144 - H223	0.006466	0.021162	3.215364	-0.001118	0.094268
Phe 334 H	PC 7	104	BCP104	H80 - C211	0.001575	0.004623	7.050962	-0.000295	1.079781
Leu811 H	PC 8	207	BCP207	H189 - C211	0.003745	0.009949	1.180501	-0.000443	0.360019
TIP3937 O	PC 9	189	BCP189	C211 - O320	0.005355	0.018995	0.940862	-0.000782	0.451161
Ala337 C	PC 10	278	BCP278	C120 - H224	0.007052	0.026702	0.724873	-0.001493	0.575164
Val333 H	PC 11	267	BCP267	H69 - N212	0.004427	0.013269	0.159155	-0.000505	0.042516
Val333 H	PC 12	2	BCP2	H68 - N220	0.005316	0.016928	0.451153	-0.000608	0.066539
TIP2503 O	PC 13	443	BCP443	H228 - O329	0.003166	0.012609	0.483274	-0.000687	0.125799
Val333 H	PC 14	76	BCP76	H67 - S225	0.005317	0.017445	0.59923	-0.001051	0.167138
Met336 C	PC 15	138	BCP138	C109 - S225	0.003697	0.012395	0.711365	-0.000706	0.095222
TIP2216 O	PC 16	20	BCP20	H227 - O326	0.006936	0.025172	0.033965	-0.000841	0.040411
TIP2216 O	PC 17	29	BCP29	H229 - O326	0.008777	0.028942	0.027554	-0.000654	0.010954
Asp139 O	PC 18	293	BCP293	O14 - C216	0.005221	0.019325	1.602527	-0.000844	0.035668
TIP1396 O	PC 19	468	BCP468	C217 - O350	0.00306	0.009091	2.034859	-0.000401	0.662411
Asn140 O	PC 20	41	BCP41	O32 - H230	0.006626	0.025009	0.925949	-0.001116	0.416455
Asn140 N	PC 21	296	BCP296	N33 - H230	0.005561	0.018579	0.091741	-0.000737	0.023813
TIP2943 O	PC 22	305	BCP305	H230 - O356	0.003897	0.016456	4.33029	-0.000833	0.452667
TIP1280 O	PC 23	5	BCP5	O4 - C218	0.008353	0.028639	0.942228	-0.001027	0.440241
TIP2943 O	PC 24	308	BCP308	H231 - O356	0.007716	0.028806	0.147988	-0.000964	0.032027
TIP3987 O	PC 25	286	BCP286	C219 - O353	0.002706	0.009479	1.503209	-0.000511	0.065069
TIP7116 O	PC 26	9	BCP9	O7 - H232	0.004172	0.015154	0.259351	-0.000814	0.111377

Confórmero en el equilibrio minimizado del sistema 815:

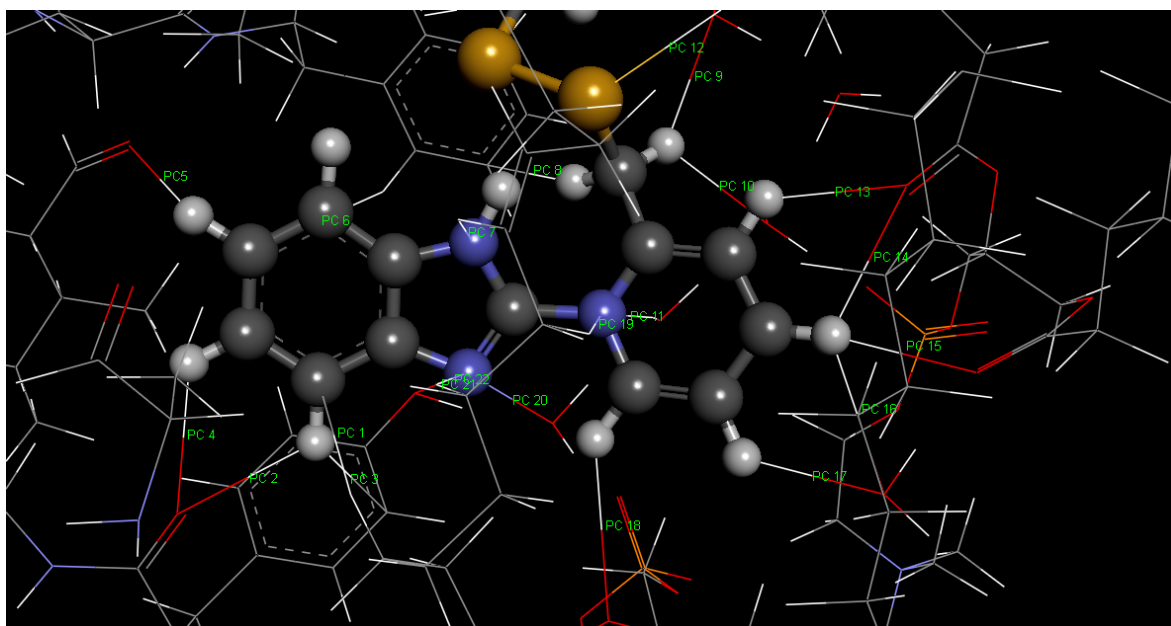


**Figura 58.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 815 con átomos de moléculas cercanas en el confórmero del equilibrio minimizado.

**Tabla 30.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 815 con átomos de moléculas cercanas en el conformero del equilibrio minimizado.

Final		BCP	Name	Atoms	Rho	desSqRho	Ellip	K	BPL-GL
Arg330 N	PC 1	113	BCP113	N89 - N189	0.004081	0.011881	0.0326	-0.000335	0.010294
TIP634 H	PC 2	239	BCP239	N189 - H301	0.019045	0.059882	0.113761	-0.000414	0.021213
Arg330 N	PC 3	121	BCP121	N92 - H196	0.004062	0.013724	0.082226	-0.000674	0.02701
TIP3591 H	PC 4	245	BCP245	C184 - H291	0.008228	0.026169	0.877787	-0.001195	0.377757
TIP4483 H	PC 5	253	BCP253	H197 - O293	0.004525	0.018046	0.307261	-0.000888	0.060148
TIP4766 O	PC 6	279	BCP279	H197 - O320	0.00851	0.029869	0.47491	-0.001134	0.239038
Leu811 H	PC 7	183	BCP183	H144 - C185	0.007534	0.025995	1.741086	-0.001375	0.097979
Leu813 O	PC 8	212	BCP212	O168 - H198	0.007789	0.029884	0.140411	-0.001019	0.030694
Gly814 H	PC 9	189	BCP189	H174 - C186	0.002096	0.006601	0.370935	-0.000416	0.071227
TIP3748 O	PC 10	177	BCP177	H199 - O308	0.006017	0.020771	0.005708	-0.000859	0.016629
TIP6853 O	PC 11	238	BCP238	O7 - N187	0.002776	0.009615	1.485492	-0.000427	0.029953
TIP2372 O	PC 12	21	BCP21	H3 - N195	0.019326	0.064899	0.258329	-0.000636	0.002448
TIP6853 O	PC 13	1	BCP1	O7 - H203	0.003596	0.011747	0.336356	-0.000639	0.012407
Cl1525	PC 14	11	BCP11	H203 - Cl329	0.004131	0.012076	1.158611	-0.000629	0.238839
Val333 H	PC 15	128	BCP128	H104 - S200	0.00653	0.019368	0.071097	-0.001041	0.012822
ASN140 O	PC 16	50	BCP50	O45 - S200	0.004286	0.015216	0.121167	-0.000756	0.033603
Asp139 O	PC 17	30	BCP30	O28 - H202	0.005275	0.019777	0.077324	-0.000819	0.010577
ASN140 O	PC 18	262	BCP262	O45 - H204	0.012454	0.039699	0.09543	-0.000409	0.027099
ASN140 H	PC 19	56	BCP56	H47 - C191	0.00588	0.022014	1.120001	-0.001272	0.508665
Val333 H	PC 20	135	BCP135	H107 - C191	0.002133	0.005658	2.330906	-0.000281	0.208094
TIP4323 O	PC 21	284	BCP284	H205 - O326	0.009335	0.030227	0.055102	-0.000546	0.006268
TIP5742 O	PC 22	265	BCP265	O4 - H205	0.004563	0.017455	0.945814	-0.00086	0.515383
TIP8132 O	PC 23	285	BCP285	H205 - O311	0.008537	0.031458	0.275182	-0.001081	0.106125
TIP2632 O	PC 24	261	BCP261	C193 - O323	0.006317	0.018574	0.435334	-0.000602	0.090118
TIP1178 O	PC 25	287	BCP287	H206 - O302	0.011277	0.038051	0.092826	-0.000749	0.036368
TIP3411 O	PC 26	288	BCP288	H207 - O287	0.009337	0.036226	0.123603	-0.00121	0.084285
TIP4544 O	PC 27	276	BCP276	H207 - O296	0.004472	0.01911	0.155953	-0.000927	0.034573
Val333 H	PC 28	257	BCP257	H110 - C194	0.002682	0.00856	0.604859	-0.000509	0.020495

Confórmero inicial minimizado del sistema 824:

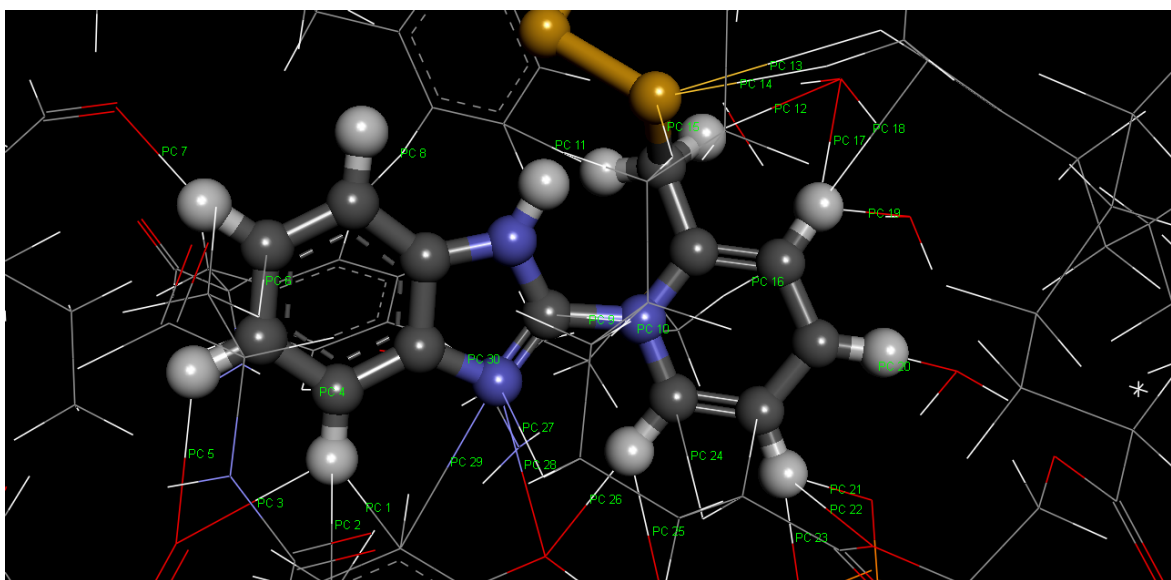


**Figura 59.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 824 con átomos de moléculas cercanas en el confórmero inicial minimizado.

**Tabla 31.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 824 con átomos de moléculas cercanas en el conformero inicial minimizado.

Inicial		BCP	Name	Atoms	Rho	desSqRho	Ellip	K	BPL-GL
POPC28 H	PC 1	309	BCP309	H37 - C352	0.003821	0.011244	0.364953	-0.000606	0.098555
tyr142 O	PC 2	311	BCP311	O211 - H365	0.007302	0.02843	0.360213	-0.001174	0.108013
tyr142 C	PC 3	288	BCP288	C208 - H365	0.006499	0.020575	3.336299	-0.001008	0.180735
tyr142 O	PC 4	315	BCP315	O211 - H364	0.007879	0.029885	0.231765	-0.001102	0.068574
ile816 O	PC 5	384	BCP384	O263 - H363	0.001791	0.006814	0.571213	-0.000459	0.057627
Phe820 H	PC 6	364	BCP364	H301 - C349	0.004675	0.013573	0.911452	-0.00069	0.585875
POPC28 H	PC 7	344	BCP344	H52 - N355	0.004698	0.014368	0.280654	-0.000541	0.027696
Phe820 C	PC 8	531	BCP531	C302 - H369	0.005736	0.018559	0.577725	-0.001018	0.30048
TIP2178 O	PC 9	530	BCP530	O188 - H368	0.001677	0.006877	1.002365	-0.000466	0.149669
TIP3532 O	PC 10	267	BCP267	O185 - H368	0.005021	0.020332	0.057881	-0.00091	0.024857
TIP8869 H	PC 11	16	BCP16	N361 - H467	0.016788	0.056967	0.362974	-0.000736	0.00268
POPC4 H	PC 12	214	BCP214	H155 - S366	0.004265	0.01367	0.037296	-0.000885	0.028059
POPC4 O	PC 13	182	BCP182	O135 - H370	0.010026	0.037431	0.121085	-0.001061	0.036976
POPC4 O	PC 14	197	BCP197	O135 - H371	0.006012	0.023816	0.436572	-0.001094	0.13895
POPC4 O	PC 15	525	BCP525	O144 - H371	0.008141	0.029307	0.015734	-0.000722	0.004426
TIP4320 O	PC 16	526	BCP526	H371 - O469	0.005251	0.02494	2.630912	-0.001443	0.191081
TIP4320 O	PC 17	528	BCP528	H372 - O469	0.010376	0.03742	0.051222	-0.000863	0.026634
POPC28 H	PC 18	26	BCP26	O18 - H373	0.002425	0.010757	0.272414	-0.000736	0.013953
POPC28 O	PC 19	60	BCP60	H50 - N361	0.003114	0.010261	1.152429	-0.000474	0.046745
TIP3122O	PC 20	2	BCP2	N353 - O463	0.00462	0.016203	0.031163	-0.000534	0.019083
Tyr142 O	PC 21	294	BCP294	O204 - N353	0.00286	0.010886	2.387441	-0.00051	0.055548
POPC28 H	PC 22	62	BCP62	H46 - N353	0.00386	0.01235	2.821258	-0.000571	0.079528

Confórmero en el equilibrio minimizado del sistema 824:



**Figura 60.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 824 con átomos de moléculas cercanas en el confórmero en el equilibrio minimizado.

**Tabla 32.** Puntos críticos de enlace de los átomos del residuo CYT 824 con átomos de moléculas cercanas en el conformero en el equilibrio minimizado.

Final		BCP	Name	Atoms	Rho	desSqRho	Ellip	K	BPL-GL
tyr142 C	1	215	BCP215	C166 - H349	0.005108	0.014894	1.085036	-0.00077	0.933347
Ile145 C	2	278	BCP278	C204 - H349	0.002523	0.008018	2.815566	-0.000427	0.518189
tyr142 O	3	239	BCP239	O176 - H349	0.006999	0.027441	0.184367	-0.001095	0.056084
Phe990 H	4	463	BCP463	C336 - H478	0.006059	0.018561	0.125991	-0.000949	0.043624
tyr142 O	5	244	BCP244	O176 - H348	0.00782	0.029711	0.122458	-0.001041	0.033019
Ala146 H	6	257	BCP257	H225 - C334	0.00655	0.019936	1.374051	-0.001016	0.458481
Ile 816 O	7	342	BCP342	O247 - H347	0.002291	0.008819	0.19624	-0.000571	0.058062
Phe820 H	8	320	BCP320	H285 - C333	0.003626	0.010433	0.856479	-0.000542	0.366037
POPC28 H	9	52	BCP52	H52 - C338	0.004099	0.013653	2.497461	-0.000677	0.119033
Met986 H	10	491	BCP491	N345 - H455	0.005067	0.016109	0.79001	-0.000658	0.098967
Phe820 C	11	394	BCP394	C286 - H353	0.006018	0.019762	0.635761	-0.001093	0.364621
TIP5565 O	12	487	BCP487	H352 - O495	0.008715	0.028009	0.15714	-0.000664	0.021471
POPC4 H	13	481	BCP481	H134 - S350	0.00273	0.008144	1.304997	-0.000477	0.325743
POPC4 H	14	168	BCP168	H136 - S350	0.004119	0.013586	0.212446	-0.000878	0.020356
POPC28 H	15	69	BCP69	H58 - S350	0.00451	0.014116	0.111647	-0.000897	0.024389
Met986 H	16	490	BCP490	C341 - H454	0.003577	0.009868	1.518981	-0.000445	0.41366
TIP5565 O	17	494	BCP494	H354 - O495	0.009018	0.028673	0.058593	-0.000602	0.021328
POPC4 H	18	148	BCP148	C133 - H354	0.003165	0.008436	0.34994	-0.000462	0.74046
TIP4345 O	19	138	BCP138	H354 - O486	0.00689	0.025806	0.702405	-0.001127	0.259065
TIP1870 O	20	477	BCP477	H355 - O492	0.010691	0.035865	0.045458	-0.000708	0.02629
POPC28 O	21	28	BCP28	O22 - H356	0.006713	0.026564	5.176589	-0.001283	0.060797
POPC28 O	22	33	BCP33	O30 - H356	0.007238	0.028019	0.526362	-0.001223	0.229784
POPC28 O	23	27	BCP27	O21 - H356	0.0099	0.031602	0.109993	-0.000498	0.002656
POPC28 H	24	470	BCP470	H35 - C344	0.007542	0.023909	1.46254	-0.00127	0.936122
TIP1635 O	25	226	BCP226	H357 - O489	0.0049	0.020263	0.366256	-0.000967	0.044123
Tyr142 O	26	228	BCP228	O169 - H357	0.005876	0.02171	0.101835	-0.00082	0.014147
POPC28 H	27	287	BCP287	H49 - N337	0.003222	0.010399	0.111756	-0.000528	0.035665
Tyr142 O	28	224	BCP224	O169 - N337	0.003538	0.013133	0.573693	-0.000586	0.01158
Tyr142 C	29	221	BCP221	C166 - N337	0.002655	0.008493	2.792249	-0.000401	0.54919
Phe990 H	30	469	BCP469	N337 - H474	0.003715	0.012523	1.149404	-0.000626	0.045099

# Theoretical study of the smiles rearrangement in the activation mechanism of proton pump inhibitors

Jorge Reyes-González<sup>a</sup>, Rosa María Gómez<sup>b</sup> and Fernando Cortés-Guzmán<sup>a,b\*</sup>



This work describes the conformational behavior and the activation mechanism of timoprazole and substituted prazoles from the most stable conformation to the sulphenic acid. The stability of the conformers can be explained by the presence of hydrogen bonds, stereoelectronic effect because of the lone pair of sulfur atom and the N<sup>+</sup>C and N<sup>+</sup>S interactions. The first step of the Smile rearrangement is a nucleophilic addition to benzimidazole by pyridine moiety, which depends on the difference of the electron population of the atoms involved in the attack. The second step produces sulphenic acid by a concerted reaction where breaking of the S–C bond goes along with a proton migration, and is determined by the electron population of the sulfur atom. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd. Supporting information may be found in the online version of this paper.

**Keywords:** activation mechanism; conformational analysis; omeprazole; prazole; sulphenic acid

## INTRODUCTION

The acid gastric secretion occurs in parietal cells of the stomach when the gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, a proton pump, transports one hydrogen ion (H<sup>+</sup>) from the cytoplasm in exchange for one potassium ion (K<sup>+</sup>) retrieved from the gastric lumen.<sup>[1]</sup> The proton pump inhibitors (PPIs) are the most potent inhibitors of acid secretion available to treat many gastric conditions.<sup>[2]</sup> Scheme 1 shows the basic structure of PPIs, timoprazole (pyridyl methylsulfinyl benzimidazole) and some of its analogues.

The proposed action mechanism of PPIs has three steps: (i) inactive form of PPIs (prodrug) accumulation in the gastric parietal cell, because of the acid conditions; (ii) prodrug conversion to the active form; and (iii) the reversible and irreversible covalent binding<sup>[3]</sup> of the active form to the gastric proton pump by a disulfur bond to specific cysteines, inhibiting enzymatic activity.

The proposed activation mechanism of PPIs is presented in Scheme 2, which proceeds via a Smiles rearrangement.<sup>[4–7]</sup> The general view of Smiles rearrangement involves a heteroatom substitution, a sequence of intramolecular addition and elimination, where the leaving groups on the arene segment can be groups such as O, S, SO, or SO<sub>2</sub> or any substituent capable of removing the negative charge from the arene group. The nucleophiles can be OH, SH, SO<sub>2</sub>H, NH<sub>2</sub>, or NHacyl groups. The rearrangement is usually base catalysed although acid and heat catalysed rearrangements have also been reported.<sup>[8]</sup> The bridging carbon atoms between leaving and nucleophile groups can be either saturated or incorporated into an aromatic ring.

At pH < 2, there are three acid–base equilibria between the three possible protonated states of PPIs: protonated pyridine moiety, protonated benzimidazole moiety, or both. A small concentration of protonated benzimidazole allows a Smiles rearrangement because of an increase of the electrophilicity of carbon atom 2 (C2, as shown in Scheme 1) of the benzimidazole ring. In this situation, C2 undergoes a nucleophilic attack from the

pyridine nitrogen forming a spiro tricyclic structure. A subsequent elimination generates a sulphenic acid. The sulphenic acid is transformed into sulphenamide after dehydration, as presented in Scheme 2. Any of these two thiophylic species can react with the enzyme forming a disulfur bond with specific cysteines.<sup>[9]</sup>

The rate of conversion of PPIs into sulfenic acid was found to be directly dependent on the basicity of benzimidazole nitrogen of PPIs,<sup>[10]</sup> which determines the electrophilic reactivity of C2. In the activation process, the concentration of the prazole decreases following a kinetic of first order. The rate of conversion of the sulfenic acid of PPIs into the disulfide (the inhibition reaction) was found to be dependent on the electrophilicity of the sulfur atom.<sup>[11]</sup>

The aim of this work is to describe the conformational behavior and the activation mechanism of timoprazole from the most stable conformation to the sulphenic acid and to determine the substituent effect in the drug activation.

## COMPUTATIONAL METHODS

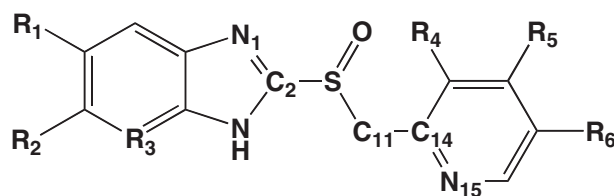
Our calculations were carried out using the GAUSSIAN 09 software (Gaussian, Inc., Wallingford, CT).<sup>[12]</sup> Geometries of the stationary points as local minima and transition states were obtained by

\* Correspondence to: Fernando Cortés-Guzmán, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, carretera Toluca-Atzacomulco km 14.5, Toluca, México 50200.  
E-mail: fercor@servidor.unam.mx

a J. Reyes-González, F. Cortés-Guzmán  
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

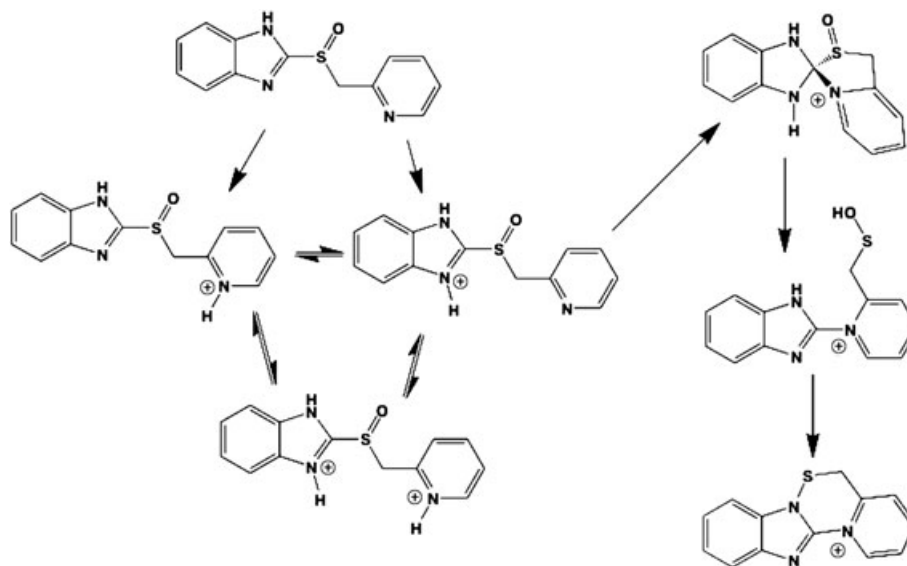
b R. M. Gómez, F. Cortés-Guzmán  
Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, carretera Toluca-Atzacomulco km 14.5, Toluca, México 50200





Compound	Commercial name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
1	Timoprazole	-H	-H	=CH	-H	-H	-H
2	Lansoprazole	-H	-H	=CH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	-H
3	Omeprazole	-H	-OCH <sub>3</sub>	=CH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
4	Pantoprazole	-H	-OCF <sub>3</sub>	=CH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
5	Picoprazole	-CH <sub>3</sub>	-COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	=CH	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
6	Rabeprazole	-H	-H	=CH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	-H
7	Tenatoprazole	-H	-OCH <sub>3</sub>	-N	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
8		-H	-H	=CH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H
9		-H	-H	=CH	-H	-OH	-H
10		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH	-H	-H	-H
11		-H	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H
12		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H
13		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-OH	-H
14		-NO <sub>2</sub>	-H	=CH-NO <sub>2</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H
15		-CF <sub>2</sub> H	-H	=CH	-H	-H	-H
16		-H	-H	=C-CF <sub>2</sub> H	-H	-H	-H
17		-CF <sub>2</sub> H	-H	=C-CF <sub>2</sub> H	-H	-H	-H

**Scheme 1.** Structure of timoprazole and its analogues



**Scheme 2.** Activation mechanism of PPIs

optimization calculations and confirmed by additional frequency analysis at 298.15 K. The transition states were characterized by performing intrinsic reaction coordinate calculations. The M06-2X<sup>[13]</sup> functional and the 6-31++G(d,p) basis set were used in the calculations. Solvent effect was incorporated by means of the Integral Equation Formalism variant of the Polarizable Continuum Model solvent method using the default radii and water as solvent. Scheme 1 shows the structure of PPIs studied in this work. Local and integrated properties of electron density were calculated with AIMALL and AIMSTUDIO software (TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA).<sup>[14]</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

### Conformational analysis of timoprazole

The conformational analysis was performed around the dihedral angles of the chain that links pyridine and protonated benzimidazole rings of timoprazole, generating the initial five geometries by inspection of the possible conformers. Once we have the optimized conformers, we calculated the respective transition state between them.

Figure 1 presents the stable conformational isomers and transition states of timoprazole, whereas Table 1 and Fig. 2 show total energy, Gibbs free energy and enthalpy differences for conformers of timoprazole. The most stable conformer is **c1** (the reference for energy differences), which presents the pyridine ring antiperiplanar to the S–O bond, with the O–S10–C11–C14 dihedral of 193.6°. A rotation of 171.1° around the S10–C11 bond produces a 1.59 kcal mol<sup>-1</sup> less stable conformer, **c2**. The eclipsed barrier between **c1** and **c2** is of 6.66 kcal mol<sup>-1</sup>. **c3** is 1.10 kcal mol<sup>-1</sup> less stable than **c1**, where N25 of the pyridine ring is directed to carbon 2 of the benzimidazole, and it is produced from **c2–c3** transition state of 6.37 kcal mol<sup>-1</sup>, where a reduction of 114° of the dihedral around the C2–S10 bond is observed, followed by a reduction of 5.8° of the dihedral around C11–C14 bond. A rotation around the S10–C11 of 119.7° gives **c4**, a linear conformer, 4.72 kcal mol<sup>-1</sup> less stable than **c1**, after a **c3–c4** barrier of 8.03 kcal mol<sup>-1</sup>. A rotation around the C11–C14 bond of 40.8° gives **c5**, more stable than **c4** conformer by 0.95 kcal. Ohishi *et al.* and Swamy and Ravikumar found that **c4** is the preferred conformer of neutral omeprazole and neutral lansoprazole sulfone in solid state.<sup>[15,16]</sup> There are two possible paths for **c1** to adopt the reactive conformation **c3**, **c1** → **c2** → **c3** and **c1** → **c5** → **c4** → **c3**. The rate-determining step (RDS) of the first path is the barrier between **c1** and **c2**, with  $\Delta H=4.7$  kcal mol<sup>-1</sup>, whereas RDS for the second path is the barrier from **c5** to **c1** with  $\Delta H=6.5$  kcal mol<sup>-1</sup>.

Figure 3 shows the molecular graphs<sup>[17–19]</sup> of the conformers of timoprazole. In **c1** and **c2**, it is possible to observe a N–H···N hydrogen bond with H···N distance of 0.1854 and 0.1643 nm, respectively. These hydrogen bonds were characterized by a bond critical point (BCP).<sup>[20]</sup> The electron densities at the H···N BCP

are 0.0400 and 0.0722 a.u. for **c1** and **c2**, respectively. **c2** is less stable than **c1** because of the orientation of the nonbonded charge concentrations (NBCC) of the sulfur atom, as shown by the Laplacian of electron density ( $\nabla^2\rho$ )<sup>[21]</sup> envelopes in Fig. 3. A lone pair of atoms can be identified with NBCC as defined by  $\nabla^2\rho$ . In the case of **c1**, the NBCC is perpendicular to the benzimidazole ring whereas in the **c2** it is parallel to the ring. In **c1** the NBCC has the right orientation to delocalize to the benzimidazole ring whereas **c2** does not. The value of the NBCC is a useful way to measure the delocalization of the lone pair.<sup>[22]</sup> The  $\nabla^2\rho$  value for the sulfur NBCC is 0.1817 and 0.1848 a.u. for **c1** and **c2** respectively, where a smaller value is associated with larger delocalization. The delocalization of the lone pair into the benzimidazole ring produces a reduction of the C2–S10 bond by 0.0087 nm in **c1**.

From the  $\nabla^2\rho$  envelope of **c3**, it is possible to observe a donor–acceptor interaction between N15 of the pyridine ring and C2 of benzimidazole, with a distance of 0.29 nm and a  $\rho_{\text{BCP}}=0.0139$  a.u. This is the reactive conformation, which allows the Smiles reaction. **c3** also presents a hydrogen bond between the hydrogen atom of protonated N1 and the oxygen atom of the S=O group, with a distance of 0.2303 nm and a  $\rho_{\text{BCP}}=0.018$  a.u.

The molecular graph of **c5** presents an interesting N···S interaction with a N15–S10 distance of 0.2819 nm and a  $\rho_{\text{BCP}}=0.0244$  a.u. Hayashi *et al.* have already suggested the existence of a N···S interaction in neutral rabeprazole, based on crystallographic distances.<sup>[23]</sup> These authors synthesized several derivatives of rabeprazole, which presented N···S distances around 0.27–0.28 nm.  $\nabla^2\rho$  envelope map of **c5** in Fig. 3 can help to understand the N···S interaction. Around the sulfur core, it is possible to observe an NBCC related to the lone pair of sulfur atom but also charge

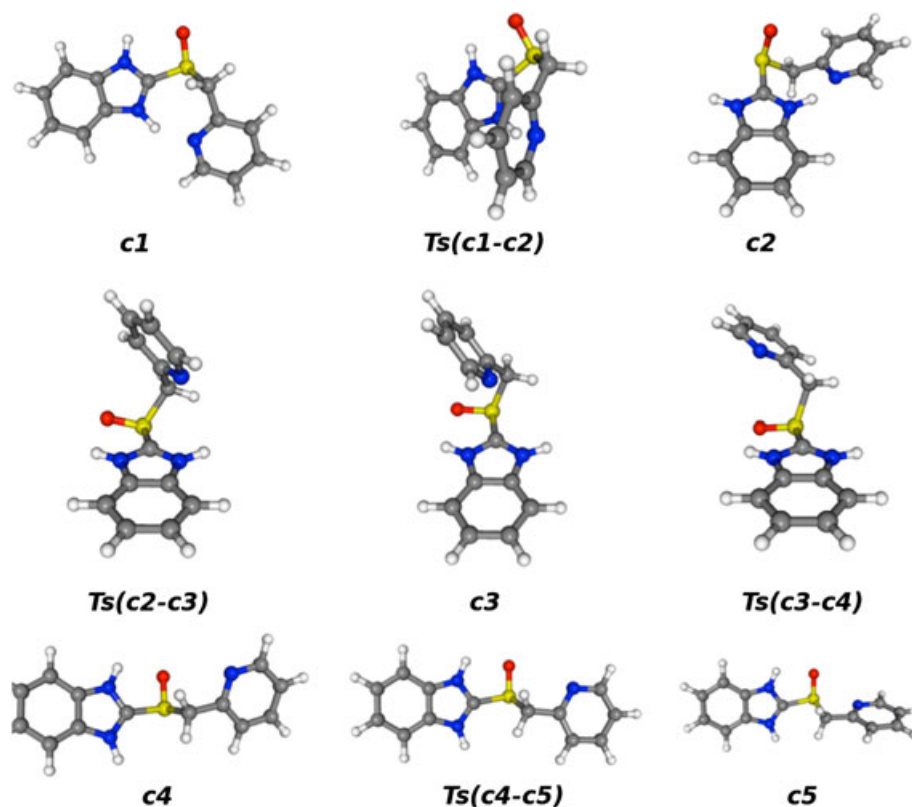
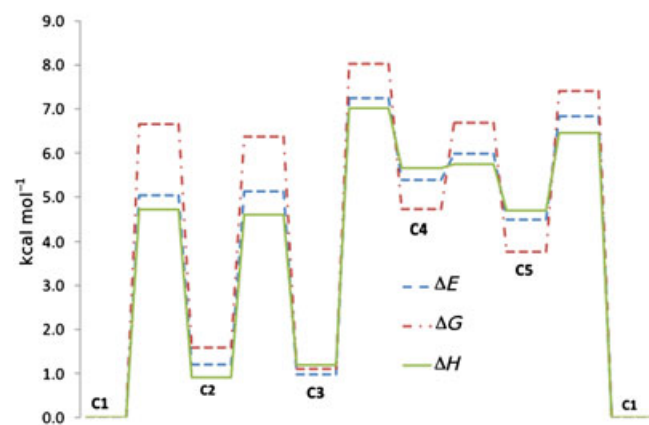


Figure 1. Stable conformers of timoprazole and transition states between them

**Table 1.** Total energy, Gibbs free energy and enthalpy differences for conformers and structures involved in the activation process of timoprazole in kcal mol<sup>-1</sup>

Structure	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta H^a$
<b>c1</b>	0.00	0.00	0.00
<b>TS (c1–c2)</b>	5.04	6.66	4.71
<b>c2</b>	1.20	1.59	0.91
<b>TS (c2–c3)</b>	5.12	6.37	4.60
<b>c3</b>	0.98	1.10	1.19
<b>TS (c3–c4)</b>	7.25	8.03	7.02
<b>c4</b>	5.38	4.72	5.66
<b>TS (c4–c5)</b>	5.98	6.69	5.74
<b>c5</b>	4.48	3.77	4.69
<b>TS (c5–c1)</b>	6.83	7.41	6.46
<b>c3</b>	0.98	1.10	1.19
<b>TS (c3–S)</b>	11.76	12.18	10.65
<b>S</b>	6.14	7.55	6.11
<b>TS (S–SA)</b>	13.10	13.01	10.79
<b>SA</b>	-9.99	-9.44	-9.46

<sup>a</sup>Calculated at 298.15 K.**Figure 2.** Energy profile of the conformational analysis of timoprazole. Electronic energy in blue, free Gibbs energy in red and enthalpy in green

depletion oriented toward the NBCC of the nitrogen atom of the pyridine ring. The N<sup>⋯</sup>S interaction can be characterized as a donor–acceptor interaction<sup>[24]</sup> where the sulfur atom plays the acceptor role. This interaction produces a linear conformer slightly more stable than the other linear conformer **c4**. Figure 3 also shows the molecular orbital related to the N<sup>⋯</sup>S interaction. The conformational behavior of timoprazole can be explained by the presence of hydrogen bonds, stereoelectronic effect because of the lone pair of sulfur atoms and the N<sup>⋯</sup>C and N<sup>⋯</sup>S donor–acceptor interactions.

### Smiles rearrangement of timoprazole

The second part of Table 1 and Fig. 4 show the energy profile of the Smiles rearrangement of timoprazole, which is initiated by the nucleophilic attack of nitrogen of the pyridine ring to the C2 of benzimidazole in the **c3** conformation. This is an endothermic reaction with a barrier of 12.18 kcal mol<sup>-1</sup> to give a spiro structure, **S**. From **c3** to **TS(c3–S)**, the N15–C2 distance decreases to 0.191 nm 71.6% of the distance change in the addition

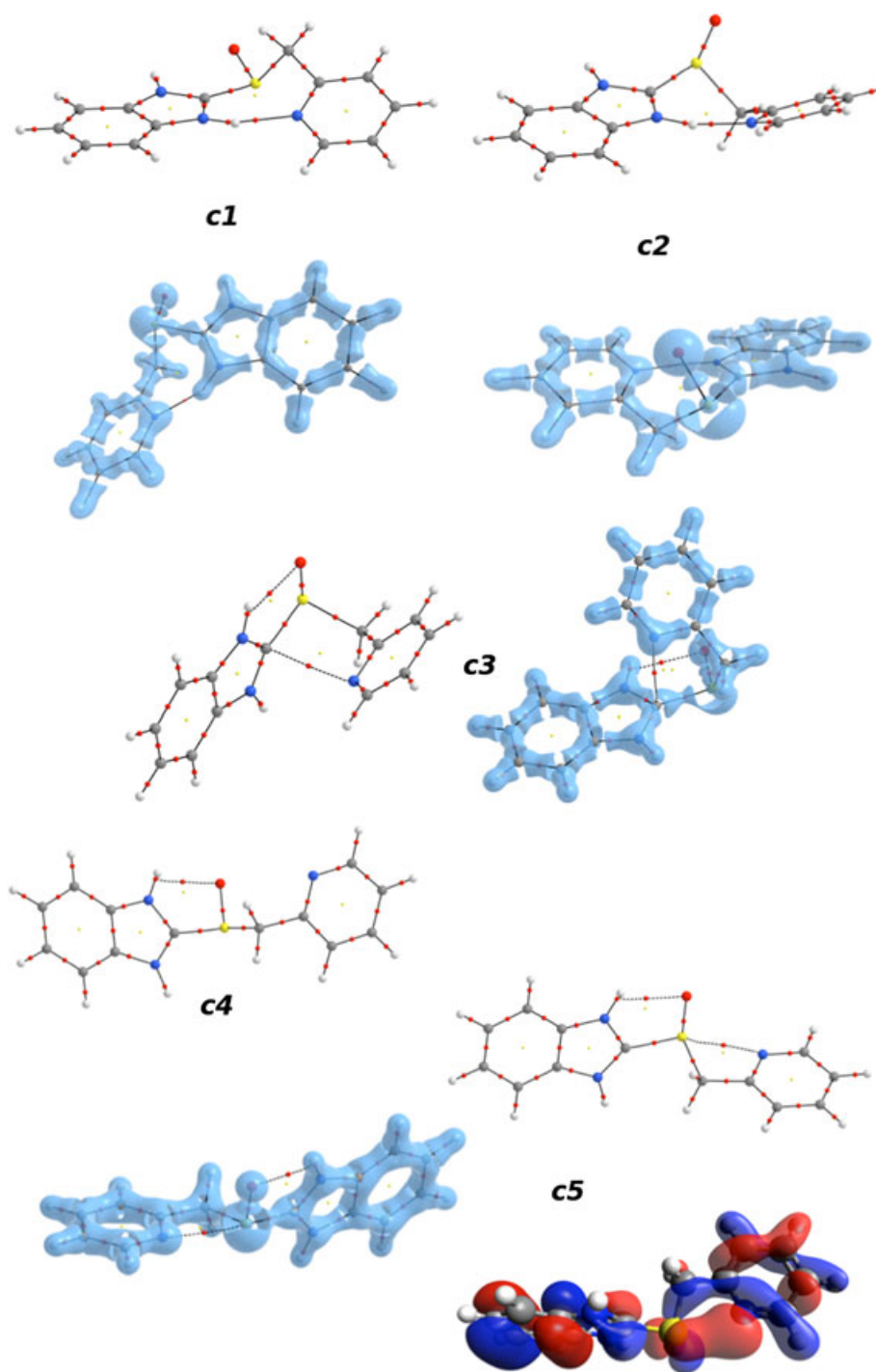
reaction. After the transition state, a reduction of 0.04 nm is observed to give the final N15–C2 distance of 0.1509 nm in **S**.

The second step of the Smiles rearrangement is a concerted reaction where a proton migrates from the N7 to the O16 atoms, which goes with the breaking of the S10–C2 bond to produce the sulphenic acid, **SA**, an active form of the prazole drugs, as shown in Figs. 4 and 5. The transition state of the concerted step is 5.46 kcal mol<sup>-1</sup> above the spiro structure. **SA** is 9.44 kcal mol<sup>-1</sup> more stable than **c1**. The S10–C2 distance increases 0.181 nm from **S** to **SA**, where the enlargement at the transition state is 0.0361 nm 20% of the distance change. At the **TS(S–SA)**, the N–H and H–O bond distance changes are connected, while the N–H distance increases 0.012 nm (13.96%) and H–O distance decreases 0.083 nm (66.4%). In the same transition state, S–O and C–N distances just change 0.006 nm (38.21%) and 0.005 nm (43.54%), respectively.

### Conformational analysis of substituted prazoles

The conformational analysis of substituted prazoles was performed at the same theoretical level, finding the stable conformers of each, and labeling them in the same way as the timoprazole conformers and presented in Table 2. In general they present the same behavior of timoprazole and exhibit **c1** as the most stable conformer, whereas conformers **c2**, **c3**, **c4** and **c5** are on average, 1.5, 1.9, 5.7 and 4.7 kcal mol<sup>-1</sup> less stable than **c1**, respectively. Electron-withdrawing substituents in benzimidazole moiety destabilize the reactive conformation **c3**, whereas the same kind of substituents on the pyridine ring stabilizes it.

Some prazoles present a proton migration from benzimidazole moiety to pyridine ring. The expected conformer **c2** for rabeprazole (Fig. 6) and prazole 10 is not observed because of migration. In the case of prazoles 11 to 14, **c1** and **c2** converged to just one conformer with protonated pyridine. The proton migration is observed with strong electron-withdrawing substituents in benzimidazole moiety or/and good electron donors in the pyridine ring.

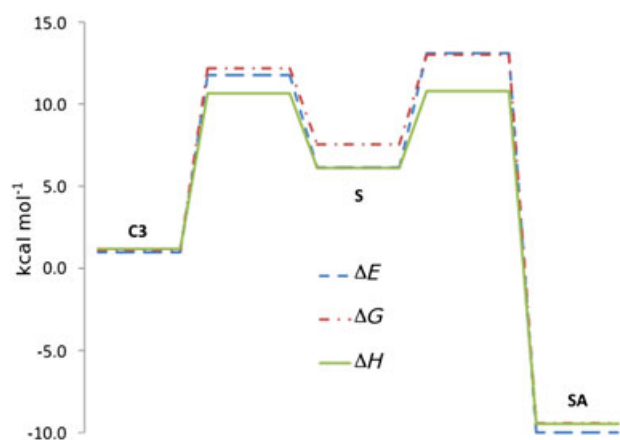


**Figure 3.** Molecular graph of conformers of timoprazole and  $\nabla^2\rho$  envelope maps of selected conformers

### Smiles reaction of substituted prazoles

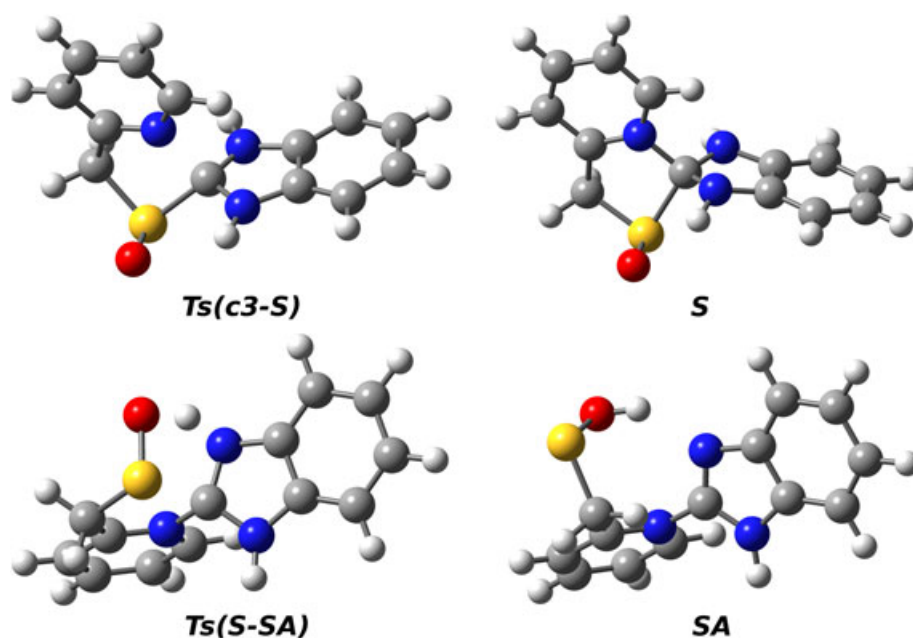
Tables 3 and 4 present electronic energy, Gibbs free energy and enthalpy differences of each barrier of Smiles rearrangement of substituted prazoles, with **c3** as reference because the most stable conformer is not the same for all prazoles. In general the first barrier is the rate-determining step, except for 12, 13 and 14, whose second activation energy ( $E_a$ ) is larger than the first one by 1.90, 2.14 and 2.42 kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. For 11 and 12, both  $E_a$  are very close. The energy changes during the activation reaction are modulated by the substituent on the rings.

Electron-donating groups in the pyridine and electron-withdrawing groups in the benzimidazole promote the addition attack from N15 to C2, whereas the electron-withdrawing groups in pyridine and electron-donating groups in benzimidazole reduce the attack possibility. The commercial prazoles have the first  $E_a$  (**c3–5**) around 8.7 kcal mol<sup>-1</sup>, just 0.8 kcal mol<sup>-1</sup> smaller than the barrier of timoprazole. The largest value of  $\Delta H$  (**c3–5**) corresponds to the compound 8, where the –NO<sub>2</sub> group on the pyridine ring makes the required nucleophilic attack difficult, 4.0 kcal mol<sup>-1</sup> larger than for 1. Compounds 13 and 14,



**Figure 4.** Energy profile of Smiles rearrangement in the prodrug-drug activation of timoprazole

which have an -OR donating group on the pyridine ring and two -NO<sub>2</sub> groups on the benzimidazole, present the smallest  $E_a$ , 5.7 and 6.0 kcal mol<sup>-1</sup> smaller than timoprazole, respectively. It seems that an electron-donor group in the pyridine decreases the barrier in 0.58 kcal mol<sup>-1</sup>, whereas an electron-withdrawing group increases the barrier in 4.0 kcal mol<sup>-1</sup>. An -NO<sub>2</sub> group at R<sub>1</sub> or R<sub>3</sub> decreases  $\Delta H(c3-S)$  in 2.9 kcal mol<sup>-1</sup>, whereas a nitro group in both positions gives a barrier of 5.5 kcal mol<sup>-1</sup> smaller than that for timoprazole; the withdrawing effect of -NO<sub>2</sub> group at R<sub>1</sub> and R<sub>3</sub> positions is not additive. In general, the spiro structure **S** is less stable than **c3** by 3.05 kcal mol<sup>-1</sup>, except for molecules 10 to 14 where the nitro groups stabilize the C2-N15 bond. On average, 10-14 are 4.8 kcal mol<sup>-1</sup> more stable than **c3**. In the case of the second barrier (**S-SA**), using **S** as reference, the larger value corresponds to the prazoles with -NO<sub>2</sub> groups in the benzimidazole, whereas the smaller barriers correspond to prazoles with an -OR group in the pyridine moiety, as commercial prazoles have.



**Figure 5.** Structures involved in the Smiles rearrangement of timoprazole

## Correlations

Menger *et al.* found that the activation energies for four Smiles reactions vary with the distance squared between the nucleophilic and electrophilic atoms.<sup>[25]</sup> Here, we want to report a relationship between the atomic populations of the atoms involved in the Smiles reaction and the reaction barriers, as useful reactive index for the intramolecular nucleophile attack in prazoles. It is possible to calculate the electronic population of each atom defined by the gradient of electron density.<sup>[26]</sup> The difference between the electron population ( $\Delta N$ ) of the nucleophile atom (N25) and electrophile atom (C2) can be related with  $\Delta E$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta H$  of the first step of the Smiles reaction by the Eqns (1)–(3) with  $R^2 = 0.85$ . From figures 6 and 7 it is possible to observe that a small  $\Delta N$  gives larger barriers and vice versa.

$$\Delta E = -171.35 \Delta N + 596.01 \quad (1)$$

$$\Delta G = -138.76 \Delta N + 484.77 \quad (2)$$

$$\Delta H = -160.53 \Delta N + 557.72 \quad (3)$$

The electron population of the sulfur atom, N(S), can be related with  $\Delta E$  and  $\Delta H$  of the second step of the activation reaction by the Eqns (4) and (5) with  $R^2 = 0.93$ . The presence of electron donating groups in the pyridine rings provokes larger C2-S distances, larger N(S) and small barriers.

$$\Delta E = -33.393 \Delta N + 499.74 \quad (4)$$

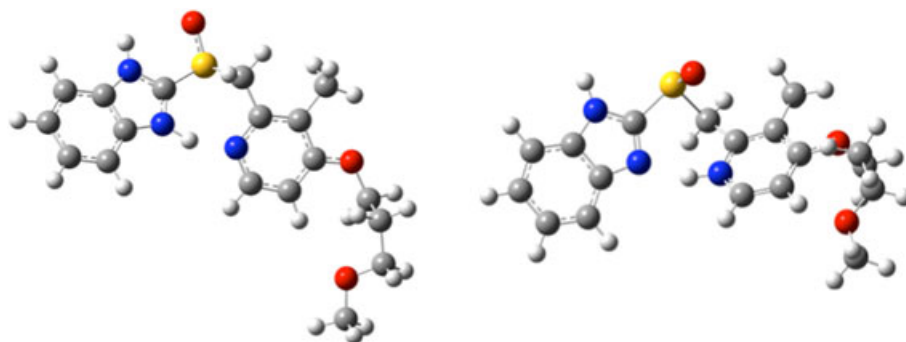
$$\Delta H = -22.203 \Delta N + 332.31 \quad (5)$$

Ife *et al.* found that there is no simple relationship between the pyridine basicity, stability and *in vivo* biological activity.<sup>[27]</sup> In the pyridine ring system, the degree of nucleophilicity of nitrogen atom, rather than its basicity, reflects the ease of spiro intermediate formation.<sup>3</sup> Whereas, Suschitzky and Wellsin reported

**Table 2.** Total energy and Gibbs free energy for conformers of substituted prazoles, in kcal mol<sup>-1</sup>

Structure	c2		c3		c4		c5	
	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta E$	$\Delta G^a$
1	1.20	1.59	0.98	1.10	5.38	4.72	4.48	3.77
2	1.53	1.43	1.00	2.06	5.33	5.83	4.03	4.99
3	1.37	1.27	0.80	1.07	5.43	4.30	4.03	4.45
4	1.19	0.70	1.49	2.09	5.22	5.00	4.98	5.15
5	1.07	1.18	0.62	0.63	5.20	6.41	3.76	3.21
6	*	*	1.30	2.07	5.65	6.15	4.28	4.58
7	1.10	1.70	0.78	2.10	5.45	5.32	4.01	5.55
8	1.51	1.38	-0.16	0.75	4.26	3.56	3.51	2.75
9	1.13	1.56	1.26	2.43	5.79	5.52	4.84	4.72
10	*	*	1.35	2.47	6.03	6.33	5.04	4.86
15	1.16	2.43	0.98	2.85	5.53	6.04	4.77	5.48
16	1.28	1.51	1.61	2.12	6.35	6.83	5.63	4.94
17	1.14	1.93	1.88	2.96	6.57	7.93	5.69	6.38

<sup>a</sup>Calculated at 298.15 K.  
\*Conformer no observed.

**Figure 6.** Proton migration from benzimidazole moiety to pyridine ring of rabeprazole**Table 3.** Total energy, Gibbs free energy and enthalpy differences for the barrier c3-S, in kcal mol<sup>-1</sup>, and electronic atomic population, in electrons, difference between C2-N25

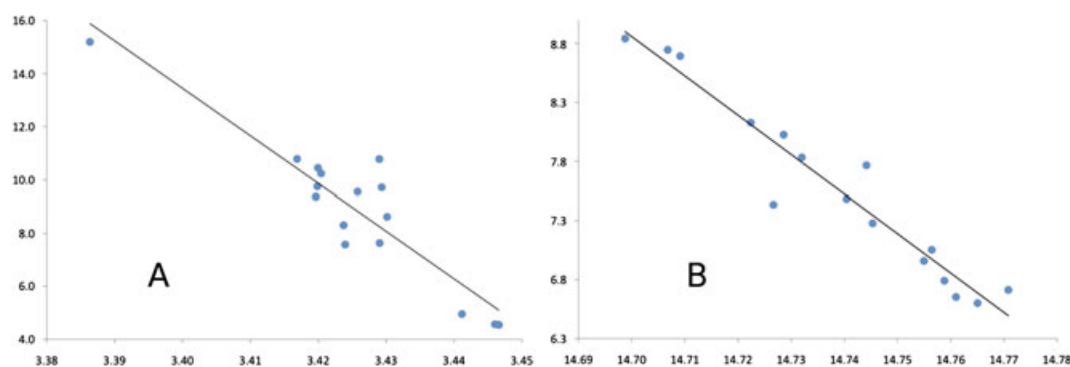
Structure	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta H^a$	$\Delta N(\text{C2-N25})$
1	10.8	11.1	9.5	3.417
2	9.7	9.2	8.3	3.429
3	10.8	11.4	9.7	3.429
4	9.6	9.4	8.2	3.426
5	8.6	9.5	7.5	3.430
6	10.1	9.4	8.5	3.434
7	10.4	10.3	9.3	3.420
8	15.2	14.2	13.5	3.386
9	10.2	10.4	8.9	3.420
10	7.6	8.3	6.5	3.429
11	7.6	8.2	6.5	3.424
12	5.0	6.7	4.0	3.441
13	4.5	5.8	3.8	3.447
14	4.6	5.6	3.5	3.446
15	9.8	10.1	8.6	3.420
16	9.4	10.4	8.3	3.420
17	8.3	9.2	7.3	3.424

<sup>a</sup>Calculated at 298.15 K.

**Table 4.** Total energy, Gibbs free energy and enthalpy differences for the barrier **S-SA**, in kcal mol<sup>-1</sup>, and electronic atomic population, in electrons, of sulfur atom

Structure	$\Delta E$	$\Delta G^a$	$\Delta H^a$	N(S)
1	6.96	5.46	4.68	14.75
2	7.05	5.32	5.28	14.76
3	6.71	6.04	4.57	14.77
4	6.79	5.14	4.36	14.76
5	7.77	6.52	5.17	14.74
7	6.65	5.56	4.38	14.76
8	7.43	5.88	4.99	14.73
9	6.60	5.01	4.37	14.77
10	8.02	5.64	5.16	14.73
11	8.13	6.79	5.53	14.72
12	8.84	6.77	5.90	14.70
13	8.75	6.74	5.94	14.71
14	8.69	7.05	5.92	14.71
15	7.28	5.82	4.81	14.75
16	7.48	6.08	4.92	14.74
17	7.83	6.09	5.17	14.73

<sup>a</sup>Calculated at 298.15 K

**Figure 7.** (A) Correlation between Electron population difference  $\Delta N = N(N25) - N(C2)$  with the energy barrier of the first step of the Smiles reaction. (B) Correlation between  $N(S)$  with the energy barrier of the second step of the Smiles reaction. Energy in kcal/mol and electron population in electrons

that the substitution in benzimidazole ring does not change the activity to a great extent. Furthermore, introduction of electron-withdrawing substituents like  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{SOMe}$  and  $-\text{CF}_3$ , which have the smallest activation barriers, leads to decreased enzyme inhibition.<sup>[28]</sup> The bioavailability is determined by the chemical transformation from prazole to sulphenic acid, but the proton pump inhibition is controlled by the specific interactions between the active molecule and the environment around the cysteine to which it is linked.

## CONCLUSIONS

This work describes the conformational behavior and the activation mechanism of timoprazole from the most stable conformation to sulphenic acid. Timoprazole has five conformers, one of them is the reactive conformation, which allows the Smiles rearrangement. The stability of the conformers can be explained by the presence of hydrogen bonds, stereoelectronic effect because

of the lone pair of sulfur atoms and the  $\text{N}^{\cdots}\text{C}$  and  $\text{N}^{\cdots}\text{S}$  interactions. There are two possible paths for **c1** to adopt the reactive conformation **c3**, **c1** → **c2** → **c3** and **c1** → **c5** → **c4** → **c3**. The first step of the Smiles rearrangement is a nucleophilic addition to benzimidazole by pyridine moiety, which depends on the difference of the electron population of the atoms involved in the attack. The second step produces sulphenic acid by a concerted reaction where breaking of the S-C bond goes along with a proton migration, which is determined by the electron population of the sulfur atom.

## Acknowledgements

The authors want to thank to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGTIC-UNAM) for the computer time and Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) (IN208709) for the financial support.

## REFERENCES

- [1] J. M. Shin, O. Vagin, K. Munson, G. Sachs, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2009**, *457*, 609.
- [2] J. M. Shin, O. Vagin, K. Munson, M. Kidd, G. Sachs, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 264.
- [3] K. S. Jain, A. K. Shah, J. Bariwal, S. M. Shelke, A. P. Kale, J. R. Jagtap, A. V. Bhosale, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1181.
- [4] W. E. Truce, W. J. Ray, O. L. Norman, D. B. Eickemeyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3625.
- [5] W. E. Truce, E. M. Kreiderand, W. W. Brand, *Org. React.* **1970**, *18*, 99.
- [6] O. R. Rodig, R. E. Collier, R. K. Schlatzer, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2652–2658.
- [7] J. F. Bunnett, R. E. Zahler, *Chem. Rev.* **1951**, *49*, 273–412.
- [8] T. Nagai, Y. Fukushima, T. Kuroda, H. Shimizu, S. Sekiguchi, K. Matsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 2600.
- [9] A. Brändström, P. Lindberg, N.-Å. Bergman, T. Alminger, K. Ankner, U. Junggren, B. Lamm, P. Nordberg, M. Erickson, I. Grundevik, I. Hagin, K.-J. Hoffman, S. Johansson, S. Larsson, I. Löfberg, K. Ohlson, B. Persson, I. Skånberg, L. Tekenbergs-Hjelte, *Acta Chem. Scand.* **1989**, *43*, 536–548.
- [10] J. M. Shin, Y. M. Cho, G. Sachs, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7800.
- [11] A. K. Al-Matar, B. El-Eswed, M. F. Tutunji, *Int. J. Chem. Kinet.* **2009**, *41*, 498.
- [12] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.1*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [13] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 157–167.
- [14] AIMAll (Version 11.05.16), Todd A. Keith, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA, **2011** (aim.tkgristmill.com)
- [15] H. Ohishi, Y. In, T. Ishida, M. Inoue, F. Sato, M. Okitsu, T. Ohno, *Acta Cryst.* **1989**, *C45*, 1921–1923.
- [16] G. Y. S. K. Swamy, K. Ravikumar *J. Struc. Chem.* **2007**, *48*, 715.
- [17] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, **1990**.
- [18] P. L. Popelier, *Atoms in Molecules: An Introduction*, Prentice Hall, London, **2000**.
- [19] C. F. Matta, R. J. Boyd, *The Quantum Theory of Atoms in Molecules: From Solid State to DNA and Drug Design*, WILEY-VCH, Weinham, **2007**.
- [20] R. F. W. Bader, H. Essen, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 1943–1960.
- [21] R. F. W. Bader, R. J. Gillespie, P. J. MacDougall, The Laplacian of the Charge Density - The Physical Basis of the VSEPR Model, in: *Molecular Structure and Energetics* (Eds: J. F. Liebman, A. Greenberg), VCH Publishers Inc., Fla., **1989**.
- [22] N. H. Werstiuk, K. E. Laidig, J. Ma, Application of Quantum Theory of Atoms in Molecules to Study of Anomeric Effect in Dimethoxymethane in: *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects* (Ed: G. R. J. Thatcher) ACS symposium series, American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.
- [23] K. Hayashi, S. Ogawa, S. Sano, M. Shiro, K. Yamaguchi, Y. Sei, Y. Nagao, *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 802.
- [24] F. Cortes-Guzman, R. F. W. Bader, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 633.
- [25] F. M. Menger, A. L. Gallowaya, D. G. Musaev, *Chem. Commun.* **2003**, 2370.
- [26] F. W. Biegler-König, R. F. W. Bader, T. H. Tang, *J. Comput. Chem.* **1982**, *13*, 317.
- [27] R. J. Iffe, C. A. Dyke, D. J. Keeling, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1970.
- [28] J. L. Suschitzky, E. Wellsin, in: *Comprehensive Medical Chemistry*, Vol. 5 (Ed: C. Hansch), Pergamon Press, Oxford, **2005**, 197–202.